Struktur, Lokalisation und Polytänisierung extranukleolärer rDNA-Introns von *Drosophila hydei*

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Gabriele Petersen
aus Kappeln/Schlei

Düsseldorf
1985

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543922_0072

INHALTSVERZEICHNIS Seite

I. EINLEITUNG 1

II. MATERIAL UND METHODEN 5

1. Abkürzungen 5

2. Verwendete Lösungen, Enzyme und Standard-DNAs 5

3. Aufzucht und genetische Konstitution der verwendeten Fliegenstämme 8

4. In-situ-Hybridisierungen 10

4.1. Herstellung von Präparaten von polytänen Chromosomen 10

4.2. Vorbehandlung der Präparate und Hybridisierung 10

4.3. Autoradiographie und Färbung 11

5. DNA-Isolierungen 12

5.1. DNA aus adulten Fliegen 12

5.2. DNA aus Organen 13

5.3. DNA aus Plasmiden 13

5.3.1. Große Präparation 13

5.3.2. Minipräparation 14

5.3.3. Größere Minipräparation 14

5.4. DNA aus λ-Phagen 15

6. Screening von λ-Phagen 17

7. Nicktranslation 18

8. Verdauung von DNA durch Restriktionsenzyme 19

9. Gelelektrophorese 19

10. Southern-Transfer 20

11. Filterhybridisierung und Autoradiographie 20

12. Subklonierung in pBR 322 21

13. Schmelzkurven 22

III. ERGEBNISSE 23

1. Der Intron-Klon pDh 3-A11 23

1.1. Kartierung von pDh 3-A11 24

1.2. Schmelzkurven von pDh 3-A11 26

2. Lokalisation extranukleolärer intronhomologer Sequenzen 28

2.1. In-situ-Hybridisierungen 28

2.1.1. Hybridisierung mit dem Intron-Klon pDh 3-A11 im Bereich des NOs 29

2.1.2. Hybridisierung mit dem Intron-Klon pDh 3-A11 außerhalb des NOs 29

2.2. Dichteposition extranukleolärer intronhomologer Sequenzen im isopyknischen CsCl-Gradienten 32

3. Replikationsverhalten bei der Polytänisierung 34

3.1. Freie X-Chromosomen (X^{*}, y m ch) 35

3.2. Attached-X-Chromosomen (y m ch/Y) 37

4. Hybridisierungen mit dem 1 kb Eco-Fragment 38

5. Charakterisierung klonierter extranukleolärer Intronsequenzen 40

5.1. Kartierung von Penelope 42

5.2. Beschreibung und Restriktionskarten der anderen Klone 47

6. Subklonierung der Fremdsequenzen 51

6.1. Hybridisierung der Subklone mit den λ-Phagen-Klonen 51

6.2. Hybridisierung der Subklone mit genomischer DNA 55

6.3. In-situ-Hybridisierungen mit den Subklonen 56

IV. DISKUSSION 58

1. Lokalisation intronhomologer Sequenzen im Nukleolus und im Heterochromatin 58

2. Lokalisation intronhomologer Sequenzen im Euchromatin 61

3. Dichteposition intronhomologer Sequenzen im isopyknischen CsCl-Gradienten 63

4. Versuch der Zuordnung der chromosomalen Positionen intronhomologer Sequenzen zu bestimmten Banden des Restriktionsmusters 64

4.1. Genotypen mit attached-X-Chromosomen 64

4.2. Genotypen mit freien X-Chromosomen 65

4.3. Bedeutung des X-chromosomalen Heterochromatins 65

5. Replikationsverhalten extranukleolärer Intronsequenzen bei der Polytänisierung 68

6. Untersuchung der klonierten Intronsequenzen 71

7. Untersuchung der subklonierten Fremdsequenzen 75

V. ZUSAMMENFASSUNG 77

VI. LITERATURVERZEICHNIS 78

VII. ANMERKUNGEN 86

I. EINLEITUNG

Die Gene für ribosomale RNA (rDNA) liegen in der Regel in multiplen Kopien in Clustern vor. Sie können im zytologischen Präparat als Nukleolusorganisatoren (NO) identifiziert werden (Ritossa et al.; 1966).

Bei Drosophila melanogaster wurde in einigen rDNA-Kopien im letzten Drittel der codierenden Region der 28 S rRNA eine intervenierende Sequenz unbekannter Funktion entdeckt (Glover; 1977).

Das Gen für 28 S rRNA wird in zwei etwa gleich große Segmente (α und ß) gegliedert. Die intervenierende Sequenz (auch Intron genannt) unterteilt das ß-Segment ungefähr in der Mitte in ß1 und ß2. 28 S rRNA-Gene mit Intron bezeichnet man als ivs^+-Gene, Gene ohne Intron als ivs^--Gene.

Ivs^+-Gene fand man dann auch bei anderen Dipteren wie Drosophila hydei (Renkawitz-Pohl et al.; 1980), Drosophila virilis (Barnett, Rae; 1979), Calliphora erythrocephala (Beckingham, White; 1980) und Sciara coprophila (Renkawitz-Pohl et al.; 1981).

Die Existenz von Introns in der rDNA ist jedoch nicht auf Dipteren beschränkt. In Plastiden (Rochaix, Malnoe; 1978), Mitochondrien (Faye et al.; 1979), einem Stamm des eukaryontischen Einzellers Tetrahymena pigmentosa (Wild, Gall; 1979), Bombyx mori (Lecanidou et al.; 1984) und Locusta migratoria (Schäfer, Kunz; 1984) wurden intervenierende Sequenzen in der rDNA gefunden.

Bei den Organellen und dem oben genannten Tetrahymena-Stamm sind alle vorhandenen rRNA-Gene von Introns unterbrochen und werden transkribiert. Bei den anderen untersuchten Organismen existieren sowohl ivs^+- als auch ivs^--Gene, von denen allerdings fast ausschließlich ivs^--Gene aktiv sind. Bei Drosophila melanogaster findet man weniger als ein Intron-Transkript pro Kern (Long, Dawid; 1979), und bei Drosophila hydei zeigen elektronenmikros-

kopische Untersuchungen, daß nur ivs$^-$-Gene exprimiert werden (Glätzer; 1979).

Bei drei der eingangs genannten Dipterenarten existiert nur eine Klasse von Introns: bei Drosophila virilis von 5 Kilobasen (kb) Länge, bei Drosophila hydei von 6 kb und bei Calliphora erythrocephala von 6.1 kb. Bei diesen dreien können Längenvariationen in Form von Tandemduplikationen auftreten (Beckingham; 1982, Review).

Bei Sciara und Drosophila melanogaster gibt es zwei einander nicht homologe Intronklassen. Bei Sciara ist die eine Klasse 0.9 kb, die andere 1.4 kb lang. Bei Drosophila melanogaster treten innerhalb der Klassen noch Längenvariationen auf: type I Introns sind 0.5, 1 und 5 kb lang (major type I); type II Introns variieren zwischen 1.5 und 4 kb. Die 0.5 und 1 kb type I Introns scheinen auf Deletionen des linken zum ß1-Segment orientierten Intronteils zurückzugehen. Auch bei Calliphora kommt es durch Deletion zu verkürzten Introns (Beckingham; 1982, Review).

Verschiedene Fragmente des major type I Introns zeigen Teilhomologien zu genomischer DNA von Drosophila hydei, Drosophila virilis, Musca und Sarcophaga (Barnett, Rae; 1979).

Sequenzanalysen der 28 S ß1 Region, in welcher die Insertionen liegen können, zeigen, daß es sich um einen ausgesprochen konservativen Bereich handelt, der zwischen zwei völlig verschiedenen Arten wie Xenopus, wo keine ivs$^+$-Gene vorkommen, und Tetrahymena noch 93 % Homologie aufweist (Gourse, Gerbi; 1980).

Bei Drosophila virilis fand man durch Sequenzanalysen an den Übergangsstellen zwischen ß1/Intron und Intron/ß2 zwei identische Oligonukleotide von 14 Basenpaaren (bp) Länge (Rae et al.; 1980). Entsprechendes gilt auch für Drosophila melanogaster (Dawid, Rebbert; 1981) und Calliphora (Smith, Beckingham; 1984). Diese duplizierten Oligonukleotide sind in der codierenden Region der 28 S-Sequenz von ivs$^-$-Genen nur einmal vorhanden.

Dies erinnert an den Integrationsmechanismus mobiler Elemente bei Pro- und Eukaryonten. Bei diesen erfolgt der Einbau unter Verdopp-

lung einer dem Genom entstammenden "target site", die je nach Element unterschiedlich lang ist (Calos, Miller; 1980)

Bei der Überprüfung, ob rDNA-Introns möglicherweise selbst mobile Elemente darstellen, fand man intronhomologe Sequenzen auch außerhalb der rDNA. Untersuchungen mit Dichtegradientenzentrifugation bei Drosophila melanogaster zeigten, daß 0.2 % des Genoms aus extranukleolären major type I intronhomologen Sequenzen besteht (Dawid, Botchan; 1977).Durch in-situ-Hybridisierungen an polytänen und mitotischen Chromosomen wurde die Position der extranukleolären major type I homologen Sequenzen bestimmt (Peacock et al.; 1981). Sie befinden sich überwiegend im X-chromosomalen Heterochromatin als Cluster in der Nähe des NOs und im Heterochromatin der Autosomen. Daneben wurde nur eine einzelne euchromatische Position bei 102 C bestimmt.

Untersuchungen an klonierten major type I homologen Sequenzen zeigten, daß es sich um ungenaue Kopien des rDNA-Introns handelt: Sie zeigen Veränderungen im Restriktionsmuster und sind meist tandemartig angeordnet. Teile der Kopien können deletiert, durch Fremd-DNA ersetzt oder von Fremd-DNA unterbrochen sein (Roiha et al.; 1981; Kidd, Glover; 1980; Dawid et al.; 1981).

Trotz Ähnlichkeiten zu anderen bei Drosophila melanogaster bekannten mobilen Elementen (Rubin; 1983, Review) spricht die Tatsache, daß die Restriktionsmuster von verschiedenen Entwicklungsstadien und Drosophila melanogaster-Stämmen nach Hybridisierung mit major type I Introns keine Unterschiede aufweisen, gegen Mobilität (Dawid et al.; 1980).

W.Kunz hat nachgewiesen, daß auch bei Drosophila hydei extranukleoläre intronhomologe Sequenzen vorkommen. Diese machen 1 % des Genoms eines attached-X-Genotyps aus. Bei einer durchschnittlichen Intronlänge von 6 kb entspricht das ca. 800 Sequenzen im diploiden Genom, von denen - kreuzungstechnisch - ca. 70 % im X-Chromosom lokalisiert sind.

Die Restriktionsmuster genomischer DNA verschiedener Drosophila hydei-Stämme sind sehr unterschiedlich. Wenn diese stammes-

spezifischen Unterschiede auf verschiedene Integrationsorte der Introns im Genom zurückgehen, stellt sich bei Drosophila hydei erneut die Frage nach der Mobilität.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden durch in-situ-Hybridisierungen an polytänen Chromosomen die extranukleolären intronhomologen Sequenzen lokalisiert. Dabei sollte gleichzeitig überprüft werden, ob die gefundenen stammesspezifischen Unterschiede im Restriktionsmuster mit unterschiedlicher chromosomaler Lokalisation einhergehen. Durch vergleichende Untersuchungen an Ganglien- und Speicheldrüsen-DNA wurde das Replikationsverhalten intronhomologer Sequenzen bei der Polytänisierung untersucht.
Zur Klärung der Struktur extranukleolärer intronhomologer Sequenzen wurde klonierte DNA molekular charakterisiert.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Abkürzungen

bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
cpm	Zählwert pro Minute
2C	diploider Chromosomensatz
d	Tage
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
h	Stunden
kb	1000 Basenpaare
min	Minuten
NO	Nukleolusorganisator
PEG	Polyethylenglycol
PVP	Polyvinylpyrrolidon
rDNA	ribosomale DNA
rRNA	ribosomale RNA
rpm	Rotorumdrehungen pro Minute
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
sec	Sekunden
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u	Einheiten

2. Lösungen, Enzyme und Standard-DNAs

Lösungen:

Denaturierungslösung: 0.25 M NaCl, 0.6 M NaOH

Denhardt-Medium (Denhardt 1966): 0.02 % w/v PVP, 0.02 % w/v Ficoll, 0.02 % w/v BSA; als 100fache Stammlösung in 2 x SSC angesetzt

Detergenzlösung: 1 % v/v Nonidet-p-40, 0.4 % w/v Na-Desoxycholat, 0.05 M Tris-HCl pH 8.0, 0.06 M EDTA

Drosophila-Ringer: 0.184 M KCl, 0.046 M NaCl, 0.003 M $CaCl_2$, 0.01 M Tris-HCl pH 7.2

Elektrophoresepuffer: 0.04 M Tris-Acetat pH 7.8, 0.01 M Na-Acetat, 0.001 M EDTA; als 20fache Stammlösung angesetzt

Filterhybridisierungslösung: 2 x SSC, 1 x Denhardt-Medium, 0.2 % w/v SDS

HOM-TOM: 0.1 M EDTA, 0.05 M Tris-HCl pH 8.0, 0.4 % v/v Nonidet-P-40

λ-dil: 0.01 M Tris-HCl pH 8.0, 0.01 M $MgSO_4$

LB: 1 % Bactotrypton (Difco), 0.5 % Bacto-Hefe-Extrakt, 0.5 % NaCl; für Agarplatten zusätzlich 1.5 - 1.7 % Agar (Difco)

Ligationspuffer: 0.066 M Tris-HCl pH 7.6, 0.05 M Dithioerythrol, 0.0066 M $MgCl_2$, 0.001 M Adenosintriphosphat

loading solution: 0.1 % w/v Bromphenolblau, 50 % v/v Glycerin, 0.1 M EDTA; in 5 x Elektrophoresepuffer

Neutralisierungslösung: 1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl pH 7.0

Nicktranslationspuffer: 0.05 M $MgCl_2$, 0.01 M ß-Mercaptoethanol, 0.05 M Tris-HCl pH 7.8, 5 % w/v BSA

Phagen-Dialyse-Puffer: 0.025 M NaCl, 0.001 M $MgSO_4$, 0.01 M Tris-HCl pH 8.0

PSB (plaque-storage-buffer): 0.01 M Tris-HCl pH 7.4, 0.1 M NaCl, 0.01 M $MgCl_2$, 0.05 % w/v Gelatine

Sinsheimer-Medium: Mischung getrennt autoklavierter Lösungen in folgendem Verhältnis: 90 ml 10 x B4 (70 g Na_2HPO_4, 30 g KH_2PO_4 ad 1 l a.dest.), 1.5 ml 5 M NaCl, 18 ml 20 % w/v Glucose, 9 ml 10 % w/v NH_4Cl, 20 ml 20 % w/v Maltose, 100 ml 10 % w/v Casa-Amino-Acids (Difco), ad 1 l a.dest., dann 1 ml 5 M $MgCl_2$ und 0.1 ml 1 M $CaCl_2$ zugeben

SSC (standard saline citrat): 0.15 M NaCl, 0.015 M Na-Citrat pH 7.0; als 20fache Stammlösung angesetzt

STET: 8 % w/v Sucrose, 5 % v/v Triton-X-100, 0.01 M EDTA, 0.05 M Tris-HCl pH 8.0

Sucroselösung: 25 % w/v Sucrose, 0.05 M Tris-HCl pH 8.0

TE^{-4}: 0.01 M Tris-HCl pH 8.0, 0.0001 M EDTA

Top-Agar: 7 g Agar (Difco)/l LB

Top-Agarose: 7 g Agarose (BRL)/l LB

Transformationspuffer: 0.01 M Tris-HCl pH 7, 0.01 M $CaCl_2$, 0.01 M $MgSO_4$

Enzyme:

DNA-Polymerase I aus E.coli (BRL oder Renner)

DNase I aus Rinderpankreas (Merck)

Lysozym aus Hühnereiweiß (Serva)

RNase A aus Rinderpankreas (Boehringer); als Stammlösung 10 mg/ml TE^{-4} angesetzt und 10 min bei 100 °C gekocht

T4-DNA-Ligase (Boehringer)

Restriktionsenzyme:

Ava I (BRL)
Bam H1 (BRL)
Bgl II (BRL)
Eco RI (Boehringer)
Hind III (PL)
Kpn I (BRL)
Pst I (Boehringer)
Sal I (Renner)
Sst I (BRL)
Xba I (BRL)

Standard-DNAs:

λ-Hind III-verdaut (Biolabs)
ØX 174-Hae III-verdaut (Biolabs)

3. Aufzucht und genetische Konstitution der verwendeten Fliegenstämme

Die Fliegen wurden bei 23 °C in Plastikflaschen auf einem Nährbrei aus Maisgrieß, Agar, Bierhefe, Sojamehl, Malz und Zuckerrübensirup gehalten.
Um für die Präparation von larvalen Ganglien und Speicheldrüsen gut angefütterte Tiere zu erhalten, wurde dem Brei zusätzlich frische Bäckerhefe untergerührt.

Für die Untersuchungen wurden aus den Zuchten von Prof. Hess (Universität Düsseldorf) Stämme folgender genetischer Konstitution verwendet:

Stämme mit freien X-Chromosomen:

X^*/X^* x X^*/Y (Wildtypstamm)

Hierbei handelt es sich um einen Stamm, der 1978 von G.Franz aus dem Institutswildstamm aufgebaut wurde (Diplomarbeit 1979). Sämtliche X-Chromosomen des Stammes gehen auf das eine X-Chromosom eines Männchens zurück.

w lt/ w lt x w lt /Y

Dieser Stamm wurde nach der gleichen Methode wie der X^*-Chromosomen enthaltende Wildtypstamm ebenfalls von G.Franz hergestellt (Dissertation 1982). Die X-Chromosomen tragen hier die genetischen Marker w und lt.

y m ch / y m ch x y m ch /Y

Ein Institutsstamm mit den X-chromosomalen genetischen Markern y, m und ch.

Stämme mit attached-X-Chromosomen:

Die Weibchen dieser Stämme enthalten jeweils ein attached-X-Chromosom. Attached-X-Chromosomen bestehen bis auf das kinetochornahe Heterochromatin aus zwei euchromatischen Schenkeln.

y m ch/Y x w lt/Y

Es handelt sich um einen Institutsstamm, dessen attached-X-Chromosom aus dem y m ch/y m ch-Stamm hervorgegangen ist.

y m ch/TKS·A x X·FP/TKS·A

y m ch/A·FP x TKS·X/A·FP

Diese beiden Stämme enthalten Autosomen-Y-Translokationen und X-Y-Translokationen (Hess; 1970), und die Weibchen besitzen wieder das y m ch/-Chromosom.

w lt/Y x X·3/Y/Y

Es handelt sich um einen Institutsstamm, dessen Weibchen ein attached-X-Chromosom mit den genetischen Markern w und lt besitzen. Die Männchen enthalten eine X-Autosomen(3)-Translokation (Hess; 1976).

w^{m1}/O x X·3/Y

Das attached-X-Chromosom der Weibchen dieses Stammes besitzt im Gegensatz zu allen anderen beschriebenen attached-X-Chromosomen auf jedem seiner euchromatischen Arme einen NO (Beck; 1976). Die Männchen des Stammes enthalten eine X-Autosomen(3)-Translokation. Die Weibchen dieses Stammes wurden zur Herstellung von X^{*}/O-Tieren verwendet.

4. In-situ-Hybridisierungen (nach Pardue, Gall; 1975)

4.1. Herstellung von Präparaten von polytänen Chromosomen

Die Herstellung von Präparaten von polytänen Chromosomen erfolgte aus Speicheldrüsen des 3. Larvenstadiums. Die Speicheldrüsenpaare wurden in Drosophila-Ringer aus weiblichen Tieren präpariert, durch Entfernen der Halsregion voneinander getrennt und direkt in frisches Fixiermedium (3 Teile Ethanol, 1 Teil Eisessig) überführt. Nach 5 - 10 min Fixierzeit wurden sie zum Quellen in 45 %ige Essigsäure gegeben. In einen Tropfen (10 µl) 45 %iger Essigsäure auf einem silikonisierten Deckglas wurde eine Speicheldrüse gegeben und, wenn möglich, in 2 - 3 Stücke zerkleinert. Anschließend wurde mit einem chromalaungelatinebehandelten Objektträger der Tropfen mit Speicheldrüse und Deckglas aufgenommen. Durch federnde Schläge mit einer Pinzette und Erhitzen auf 45 - 50 °C wurden die Zellen verteilt, die Kerne aufgebrochen und die Chromosomen ausgebreitet. Nach Einfrieren in flüssigem Stickstoff wurde das Deckglas mit einer Rasierklinge abgesprengt. Das Präparat wurde in 96 %igem Ethanol entwässert und luftgetrocknet.

4.2. Vorbehandlung der Präparate und Hybridisierung

Die Präparate wurden 1 - 2 h mit RNase A (100 µg/ml 2 x SSC) mit 200 µl/Objektträger bei Zimmertemperatur inkubiert. Nach Abschwemmen der Deckgläser in 2 x SSC wurde 3 x 5 min in 2 x SSC gewaschen, 2 x 10 min in 70 %igem und 2 x 10 min in 96 %igem Ethanol entwässert und anschließend luftgetrocknet.
Zur Denaturierung der DNA wurden die Präparate 3 min mit 0.07 N NaOH behandelt, wie oben beschrieben entwässert und luftgetrocknet.
Die zur Hybridisierung vorgesehene DNA wurde mit 0.1 N NaOH (Endkonzentration) für 15 min bei Zimmertemperatur denaturiert, eisgekühlt, mit HCl neutralisiert und auf eine Endkonzentration von 2 x SSC gebracht. Pro Objektträger wurden in einem Volumen

von 10 - 20 µl 0.5 - 1 x 10^5cpm eingesetzt. Die spezifische Aktivität der einzelnen ^{3}H-markierten DNA-Proben lag zwischen 2 und 5 x 10^6cpm/µg. Die Hybridisierung erfolgte in einer feuchten Kammer (2 x SSC) bei 65 - 68 °C für 24 - 48 h. Nach Beendigung der Hybridisierung wurden die Deckgläser in 2 x SSC abgeschwemmt und die Präparate gewaschen: 30 min in 2 x SSC bei 60 °C, 2 x 10 min in 2 x SSC bei 60 °C und 2 x 10 min in 2 x SSC bei Zimmertemperatur. Anschließend wurde wieder entwässert und luftgetrocknet.

4.3. Autoradiographie und Färbung

Zur Autoradiographie wurden die Präparate mit Photoemulsion (Kodak NTB 2 mit a.dest. 1 : 1 verdünnt) bei 45 °C beschichtet, 2 h getrocknet und anschließend bei 4 °C exponiert. Die Expositionszeiten lagen zwischen 2 und 6 Wochen. Die Entwicklung erfolgte in Kodak D-19 für 2 - 3 min bei Raumtemperatur. Nach kurzer Wässerung (30 sec) wurde in Agfa Acidofix für 10 - 15 min fixiert, 3 x in a.dest. gewaschen, und aus der letzten Waschung wurden die Präparate direkt in Färbelösung gegeben (3 - 5 % Gurr's Giemsa in 0.01 M Na-Phosphatpuffer pH 6.8). Nach 30 - 60 min Färbung wurden die Präparate kurz mit a.dest. abgespült, luftgetrocknet und in Euparal (Chroma) eingebettet.
Die Chromosomen wurden im Zeiss Photomikroskop II mit Agfapan 100 Filmen photographiert.

5. DNA-Isolierungen

5.1. DNA aus adulten Fliegen (nach T.Barnett, pers. Mitteilung)

3 - 5 g tiefgefrorene Fliegen wurden im eisgekühlten Mörser mit 20 ml HOM-TOM homogenisiert. Die Suspension wurde durch eine 100 µm Gaze gepreßt und bei 5000 rpm 10 min bei 4 °C zentrifugiert (Beckman J21-C Kühlzentrifuge, JA-20 Rotor). Der Überstand wurde verworfen und das kernhaltige Pellet in 1 - 2 ml HOM-TOM aufgenommen. Nach Zugabe von SDS (0.5 % Endkonzentration) erfolgte eine Inkubation von 15 - 30 min bei Raumtemperatur. Nach 1 - 2 Phenolextraktionen (1 Volumen Phenol mit TE^{-4} gesättigt, Phasentrennung wie bei Kernsedimentation) wurde die wässrige Phase mit 2.5 Volumen 96 %igem Ethanol versetzt. Das gefällte Material wurde bei 10.000 rpm in 10 min bei 4 °C abzentrifugiert (JA-20 oder JS-13 Rotor) und das Pellet in einer CsCl-Lösung (in TE^{-4}) einer Dichte von 1.7 g/cm³ aufgenommen.

Zur Reinigung wurden die Proben im Ti-75 oder Al-65 Rotor bei 38.000 rpm bei 20 °C für 60 - 70 h zentrifugiert (Beckman Ultrazentrifuge L5-65 oder L3-65). Die Fraktionierung der Gradienten erfolgte unter Messung der Absorption bei 254 nm (ISCO-Gradientenfraktionator mit ISCO-Absorbance Monitor UA-5). Die DNA enthaltende Fraktion wurde zur Entfernung des CsCl über Nacht gegen TE^{-4} dialysiert, die DNA mit Ethanol (2.5 Volumen) und NaCl (1/10 Volumen 1 M) gefällt, abzentrifugiert (JA-20 oder JS-13 Rotor, 10.000 rpm, 10 min, 4 °C) und in TE^{-4} zur weiteren Verwendung aufgenommen.
DNA-Mengenbestimmungen erfolgten photometrisch (Gilford Spektralphotometer Typ 2507) oder durch Abschätzung auf Agarose-Gelen mit Standard-DNAs.

Zur Auftrennung der DNA in Bereiche unterschiedlicher Dichte erfolgten Fraktionierungszentrifugationen mit flacheren Gra-

dienten als bei Reinigungszentrifugationen. Die Ausgangsdichte war wieder 1.7 g/cm³ CsCl in TE^{-4}. Es wurde jedoch bei 30.000 rpm bis zur Einstellung des Gleichgewichts 5 Tage zentrifugiert. Die DNA wurde in 10 - 12 verschiedenen Fraktionen aufgefangen und nach Fraktionen getrennt weiterbehandelt (wie bei Reinigungszentrifugation).

5.2. DNA aus Organen

Zur Präparation von DNA aus larvalen Ganglien und Speicheldrüsen wurden Larven des 3. Stadiums zur Abtrennung vom Nährbrei in 12 - 14 %iger Zuckerlösung aufgeschwemmt, abgenommen und in Drosophila-Ringer gewaschen.
Die Organe wurden in gekühltem Drosophila-Ringer herauspräpariert und in eiskaltes HOM-TOM überführt. Je 100 Organe wurden in 50 µl im Dounce-Homogenisator (tight fitting pistill) homogenisiert und nach Zugabe von SDS (1 % Endkonzentration) 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Homogenat wurde anschließend mit in TE^{-4} gesättigter CsCl-Lösung versetzt. Nacheinander wurden so 500 - 600 Organe isoliert, homogenisiert und mit CsCl versetzt. Die CsCl-Lösung wurde dann auf eine Dichte von 1.7 g/cm³ eingestellt, und die Weiterbehandlung erfolgte wie bereits für DNA aus adulten Fliegen beschrieben.

5.3. Plasmid-DNA

5.3.1. Große Präparation (nach Clarke, Carbon; 1975)

Eine einzelne Bakterienkolonie wurde in eine 10 ml LB-Flüssigkultur mit dem entsprechenden Antibiotikum (Ampicillin 100 µg/ml oder Tetracyclin 25 µg/ml) überimpft und bei 37 °C geschüttelt. Nach 8 - 10 h wurde 1 ml dieser Kultur in 250 ml LB verdünnt und über Nacht weitergeschüttelt. Die Bakterien wurden

anschließend bei 6000 rpm in 10 min bei 4 °C abzentrifugiert (JA-14 Rotor) und in 2,5 ml Sucroselösung resuspendiert. Nach Zugabe von 5 mg Lysozym in 500 µl 0.25 M Tris-HCl pH 8.0 wurde 10 min im Eis inkubiert, weitere 10 min nach Zugabe von 625 µl 0.5 M EDTA und wieder 10 min nach Zugabe von 4 ml Detergenzlösung. Die Bakterienreste wurden für 30 - 50 min bei 18.000 rpm und 4 °C abzentrifugiert (JA-20 Rotor). Der Überstand wurde mit 1 ml Ethidiumbromid (10 mg/ml a.dest.) und mit a.dest. auf 10 ml aufgefüllt, mit 8.9 g festem CsCl versetzt und 48 h bei 38.000 rpm bei 20 °C zentrifugiert (Ti-75 oder Al-65 Rotor, Beckman Ultrazentrifuge L3-65 oder L5-65). Die "supercoil"-Plasmid-DNA wurde unter UV-Licht mit einer Spritze abgezogen, 2 - 3 x mit Isoamylalkohol oder Butanol zur Entfernung des Ethidiumbromids extrahiert und wie bereits beschrieben dialysiert und weiterbehandelt.

5.3.2. Minipräparationen (nach Holmes, Quigley; 1981)

Einzelne Bakterienkolonien wurden in 5 ml LB (mit entsprechendem Antibiotikum) überimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Die Bakterien wurden bei 4000 rpm abzentrifugiert (Tischzentrifuge Christ, 5 min, Raumtemperatur). Die Pellets wurden in 380 µl STET resuspendiert, in Eppendorf-Gefäße überführt, mit 20 µl Lysozym (20 mg/ml a.dest. frisch gelöst) versetzt, 30 - 60 sec gekocht und anschließend sofort bei 12.000 g 10 min zentrifugiert (Eppendorf). Die Überstände wurden abpippetiert, mit gleichem Volumen Isopropanol versetzt und wieder zentrifugiert. Die Pellets wurden in 50 µl TE^{-4} mit 1 µl RNase A (Stammlösung) aufgenommen und direkt gelelektrophoretisch analysiert.

5.3.3. Größere Minipräparationen

Zum Erhalt größerer DNA-Mengen für Nicktranslationen und Restriktionsanalysen wurde die Minipräparationsmethode folgendermaßen modifiziert:

Die Mengen aller eingesetzten Lösungen wurden verzehnfacht, Zentrifugationen erfolgten im JA-20 Rotor, gekocht wurde in 15 ml Corex-Zentrifugenröhrchen für 2 - 3 min und die Pellets wurden in 200 µl TE^{-4} aufgenommen. Nach 30 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur mit RNase A (10 µl der Stammlösung) folgten 1 - 2 Phenolextraktionen, Fällung mit Ethanol oder Isopropanol, Zentrifugation und wieder Aufnahme in TE^{-4} (wie bereits beschrieben).
Wenn sich bei nachfolgender Gelelektrophorese herausstellte, daß zuviel E.coli-DNA die Plasmid-DNA verunreinigte, wurde die gesamte DNA auf präparativen Agarosegelen aufgetrennt und die Plasmid-DNA mittels "squeeze-freeze" aus dem Gel gewonnen (Thuring et al.; 1975). Dazu wurde der Gelbereich, der die "supercoil"-Plasmid-DNA enthielt, aus dem Gel ausgeschnitten, in eine Spritze gegeben, bei -20 °C eingefroren und nach kurzem Antauen die Flüssigkeit samt DNA aus der Agarose herausgepreßt. Nach 1 - 2 Phenolextraktionen wurde die DNA (wie beschrieben) gefällt, zentrifugiert und wieder in ensprechender Menge TE^{-4} aufgenommen.

5.4. DNA aus λ-Phagen (nach Yamomoto et al.; 1970)

Eine Einzelkolonie des Bakterienstammes K 802 wurde in 10 ml LB mit 0.2 % Maltose über Nacht bei 37 °C geschüttelt. 1 ml dieser Suspension wurde in 100 ml LB mit 0.2 % Maltose so lange bei 37 °C geschüttelt, bis eine Extinktion von 1 erreicht war (bei 650 nm). Dann wurden die Bakterien abzentrifugiert (JS-13 Rotor, 5000 rpm, 4 °C, 5 min) und in 1/4 Volumen 0.01 M $MgSO_4$ aufgenommen. 3 ml dieser Suspension wurden mit 5 x 10^8 Phagen bei 37 °C für 30 min zum Anheften der Phagen inkubiert.
Nach Zugabe von 200 ml Sinsheimer-Medium wurde die Suspension bei 37 °C heftig geschüttelt. Nach vollendeter Lyse (nach 5 - 8 h) wurde weitere 15 min mit 1 ml Chloroform geschüttelt. Nicht lysierte Bakterien und Bakterienreste wurden abzentrifugiert (JA-14 Rotor, 8000 rpm, 4 °C, 10 min), der Überstand mit

12 g NaCl versetzt und über Nacht mit 14 g PEG bei 4 °C gerührt. Gefällte Phagen und PEG wurden abzentrifugiert (JA-14 Rotor, 8000 rpm, 4 °C, 10 min), der Überstand verworfen und das Pellet in 3 ml λ-dil resuspendiert und mit 1 Volumen Chloroform extrahiert (Phasentrennung im JA-20 Rotor, 5000 rpm, 4 °C, 5 min). Die wässrige Phase wurde auf vorgeformte CsCl-Stufengradienten (je 2 ml CsCl-Lösung in λ-dil von 1.6, 1.5, 1.4 und 1.3 g/cm³ Dichte) aufgebracht. Nach Zentrifugation von mindestens 2 h im SW-40 Rotor (Beckman Ultrazentrifuge L3-65) bei 27.000 rpm und 4 °C wurde die Phagenbande mit einer Spritze abgezogen und über Nacht gegen Phagen-Dialyse-Puffer dialysiert. Nach RNase-Behandlung (20 µl RNase A (Stammlösung), 30 - 60 min bei Raumtemperatur) und Phenolextraktion wurde die DNA wie beschrieben mit Ethanol oder Isopropanol gefällt und in TE^{-4} aufgenommen.

6. Screening von λ-Phagen (nach Benton, Davis; 1977)

600 µl (200 µl) einer E.coli K 802 Suspension (siehe DNA aus λ-Phagen) wurden für eine große Agarplatte Durchmesser 13.5 cm (kleine Agarplatte Durchmesser 8.5 cm) mit 1000 (100) Phagen bei 37 °C inkubiert. Die Suspension wurde mit 7.5 (2.5) ml Top-Agarose von 50 °C vermischt, auf Agarplatten gegossen und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Nach Kühlung der Platten (1 h, 4 °C) wurde ein trockener Nitrozellulosefilter (Schleicher und Schüll, 0.45 µm Porendurchmesser) für 1 - 2 min aufgelegt, vorsichtig mit einer Pinzette abgezogen, 2 min denaturiert (Denaturierungslösung), 2 min neutralisiert (Neutralisierungslösung), 5 min in 2 x SSC gewaschen und für 2 h bei 80 °C im Vakuumschrank gebacken. Hybridisierung und Autoradiographie erfolgten wie unter II.11. beschrieben.

Phagen-plaques, die nach Hybridisierung auf dem Autoradiogramm ein Signal erzeugten, wurden mit einer 100 µl Kapillare aus der Platte ausgestanzt und in 200 µl PSB überführt. Ausgehend von 10^5 - 10^6 Phagen/plaque wurden in entsprechender Verdünnung Platten vorbereitet und weiterbehandelt, wie oben beschrieben. Diese Prozeduren wurden solange wiederholt, bis alle Phagenplaques ein Hybridisierungssignal hervorriefen. Dann wurde ein letztes Mal ein plaque ausgestanzt und amplifiziert. Dazu wurde eine kleine Agarplatte mit 200 µl E.coli K 802 und 10^3 - 10^4 Phagen in 2.5 ml Top-Agar vollständig lysiert, Phagen und Bakterien samt Top-Agarose abgekratzt, mit 2 ml PSB und 1 ml Chloroform versetzt und gut gemischt. Nach mind. 2, max. 20 h Diffusionszeit wurden Agar, Bakterien, Bakterienreste und Chloroform abzentrifugiert (JA-20 Rotor, 10.000 rpm, 10 min, 4 °C) und der phagenenthaltende Überstand über 2 - 3 Tropfen Chloroform aufbewahrt.

7. Nicktranslation (nach Rigby et al. 1977)

^{32}P

Für 0.1 - 0.2 µg DNA wurden 4 - 10 pMol ^{32}P-dCTP (Amersham Buchler, 3000 oder 400 Ci/mMol) eingesetzt. Die Inkubation erfolgte in 10 µl Nicktranslationspuffer mit 2 - 3 u DNA-Polymerase I, 50 pg DNase und einem 10 - 100fachen Überschuß an nicht radioaktiven dNTPs außer dCTP für 3 - 5 h bei 15 °C. Zur Entfernung nicht eingebauter dNTPs erfolgte eine Sperminfällung (Hoopes, McClure; 1981). Der Ansatz wurde mit TE^{-4} und einer carrier-DNA (40 µg salmon sperm) auf ein Volumen von 200 µl gebracht und nach Zugabe von 4 µl Spermintetrahydrochlorid 15 min auf Eis gehalten. Die gefällte DNA wurde in 15 min abzentrifugiert (Eppendorf), 1 - 2 x mit 0.001 M Spermintetrahydrochlorid gewaschen, in 200 µl TE^{-4} aufgenommen und 15 min bei 65 °C gelöst. Die hierdurch erreichte Aktivität betrug zwischen 10^6 und 10^8 cpm/ µg (Čerenkov - Zählung im Packard Flüssigkeitsszintillationszähler Typ 3380 oder Tri-Carb 4530).

^{3}H

Hier erfolgte die Reaktion mit ca. 200 pMol ^{3}H-dTTP (NEN, 78 Ci/mMol) und 50 pg DNase I und einem Überschuß an nicht radioaktiven dNTPs außer dTTP, ansonsten unter den gleichen Bedingungen wie für ^{32}P beschrieben. Es erfolgte ebenfalls eine Sperminfällung, die DNA wurde jedoch nur in 50 µl aufgenommen. Die erreichte Aktivität lag zwischen 10^5 und 10^6 cpm/µg (Messung von Aliquots in 5 ml Instagel II (Packard) ebenfalls im Packard Flüssigkeitsszintillationszähler).

8. Verdauung von DNA durch Restriktionsenzyme

1 - 2 µg DNA wurden in 10 - 20 µl Reaktionsvolumen mit 5 - 10 u Enzym im entsprechenden Puffer (nach Firmenangabe) bei 37 °C inkubiert, genomische DNA 5 - 6 h, Phagen- und Plasmid-DNA 2 - 3 h. Bei Doppelverdauungen wurde nacheinander jeweils 2 h inkubiert. Wenn die entsprechenden Puffer einander ähnlich waren, wurde nur das Enzym zugegeben. Bei sehr unterschiedlichen Puffern wurde die Reihenfolge so gewählt, daß durch Zugabe von konzentrierten Salzlösungen unter Vergrößerung des Volumens auch für das zweite Enzym optimale Reaktionsbedingungen geschaffen wurden.
Phagen-DNA wurde zum Aufschmelzen der Enden 15 min bei 65 °C inkubiert und auf Eis gegeben.
Nach Zugabe von 1/4 Volumen loading solution wurden die Proben gelelektrophoretisch aufgetrennt.

9. Gelelektrophorese

Die Auftrennung der nach Verdauung erhaltenen Restriktionsfragmente erfolgte in horizontalen oder vertikalen 0.5 - 1 %igen Agarosegelen im Elektrophoresepuffer mit 0.5 µg/ml Ethidiumbromid bei einer Spannung von 2 - 3 V/cm je nach Prozentigkeit des Gels zwischen 12 und 24 h.
Als Längenstandard wurden pro Gel jeweils 0.5 oder 1 µg λ-Hind III- und ØX 174 Hae III-verdaute DNA mit aufgetrennt.
Die Gele wurden im UV-Durchlicht unter Verwendung eines Rotfilters photographiert (Polaroid 107).

10. Southern-Transfer (nach Southern; 1975)

Die Gele wurden 30 - 45 min unter Schwenken denaturiert (Denaturierungslösung), 30 - 45 min neutralisiert (Neutralisierungslösung) und die DNA anschließend in 20 x SSC auf Nitrozellulose (Schleicher und Schüll, 0.45 µm Porengröße) transferiert. Die Filter wurden vorsichtig abgezogen, 10 min in 2 x SSC gewaschen und zum Fixieren der DNA 2 h im Vakuumschrank bei 80 °C getrocknet.
In einigen Fällen wurden von einem Gel zwei Filter gewonnen. Dabei wurde der erste Filter nach 1 - 2 h abgenommen, ein zweiter aufgelegt und über Nacht transferiert.

11. Filterhybridisierung und Autoradiographie

Die getrockneten Nitrozellulosefilter wurden 5 - 6 h bei 62 - 65 °C im Wasserbad in 50 - 100 ml Hybridisierungslösung vorinkubiert. Die radioaktive DNA wurde 5 min bei 100 °C denaturiert, gekühlt und in 2 - 5 ml Hybridisierungslösung verdünnt. In dieser Lösung erfolgte die Hybridisierung bei 62 - 65 °C für 12 - 24 h. Im Anschluß wurden die Filter in 2 x SSC mit 0.2 % SDS 3 - 4 h bei gleicher Temperatur unter zwei- dreimaligem Wechsel der Lösung gewaschen und anschließend kurz getrocknet.

Autoradiographie erfolgte mit Kodak X-omat Röntgenfilm bei Raumtemperatur 1 - 10 d. Wurden zur Verstärkung der Signale und zur Verkürzung der Expositionszeit Screens (Dupont) eingesetzt, wurde bei - 80 °C exponiert (Swanstrøm, Shank; 1978).

12. Subklonierung in pBR 322

3 µg Phagen-DNA und 2 µg pBR 322-DNA wurden in 45 µl mit Eco RI oder Sal I verdaut. 15 µl wurden auf einem schnellen Agarosegel (auf einem Objektträger mit 150 mA in 15 min) aufgetrennt und die Vollständigkeit der Verdauung überprüft. Die restlichen 30 µl wurden mit 2.5 Volumen Ethanol 30 min bei -80 °C gefällt und abzentrifugiert (Eppendorf). Das Pellet wurde in 10 µl Ligationspuffer aufgenommen und mit 9 u T4-DNA-Ligase 2 h bei 16 °C inkubiert. 2 µl des Ansatzes wurden zur Kontrolle wieder gelelektrophoretisch analysiert. Die verbleibenden 8 µl wurden mit Ligationspuffer auf 450 µl verdünnt und zum Ringschluß über Nacht mit 18 u T4-DNA-Ligase bei 16 °C inkubiert.

Bakterien des Stammes HB 101 wurden in 100 ml LB bei 37 °C geschüttelt, bis eine Extinktion von 0.6 erreicht war (bei 650 nm). Nach Zentrifugation (JA-20 Rotor, 5000 rpm, 4 °C, 5 min) wurde das Pellet in 1/2 Volumen 0.05 M $CaCl_2$, 0.1 M Pipes, pH 6.8 resuspendiert und 20 min im Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation und Aufnahme in 1/16 Volumen der gleichen Lösung wurde wieder resuspendiert und die Bakterien bei 4 °C aufbewahrt.

100 µl dieser Bakteriensuspension wurden mit 50 µl des Ligationsansatzes 10 min im Eis und 10 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 350 µl LB wurde eine weitere Stunde bei 37 °C inkubiert. 10 und 100 µl der transformierten Bakterien wurden mit 3 ml 45 °C warmem Top-Agar gemischt und auf einer Agarplatte ausgegossen. Top-Agar und Agarplatten enthielten die der Resistenz entsprechenden Antibiotika. In einigen Fällen wurden die Bakterien direkt auf Agarplatten ausgestrichen. Alle Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

13. Schmelzkurven

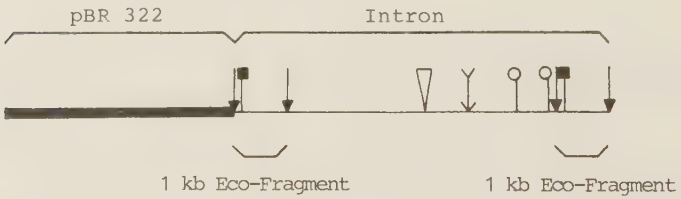
Die Extinktion der DNA-Proben wurde mit dem Gilford Spektralphotometer bei 260 nm gemessen. Die Proben wurden dann in zuschraubbare Spezialküvetten gegeben, die elektrisch beheizt wurden. Die Aufheizrate betrug 1 °C/Minute und wurde durch den Gilford Thermo-Programmer 2527 gesteuert und gemessen. Es wurden solche DNA-Konzentrationen gewählt, daß bei einer maximalen Hyperchromizität von 40 % ein Extinktions-Anstieg von 0.2 erreicht wurde. Der Schmelzverlauf wurde vom Gilford Recorder 1100 aufgezeichnet.

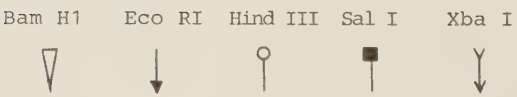
III. ERGEBNISSE

1. Der Intron-Klon pDh 3-A11

J. Morris hat die von R.Renkawitz-Pohl in pBR 322 konstruierte Drosophila hydei Wildtyp Genbank (Renkawitz-Pohl et al.;1980) mit einem Intron-Fragment eines klonierten ivs^{+}-Gens (pDh 2-H8) gescreent (Grunstein, Hogness; 1975). Sie hat einen rDNA-freien intronhomologen Klon isoliert (pDh 3-A11) und mit verschiedenen Restriktionsenzymen charakterisiert:

pDh 3-A11





Sein Restriktionsmuster stimmt mit dem des ribosomalen Introns völlig überein. Es kann jedoch nicht entschieden werden, ob er aus einem rRNA-Gen mit dupliziertem Intron oder einem extranukleolären Intron-Tandem-Cluster stammt.
Er enthält zwei identische 1 kb Eco-Fragmente, die im ribosomalen Intron nur einmal vorkommen. Dieses Fragment wurde von K.Opatz ebenfalls in pBR 322 subkloniert und besitzt keine Homologie zum restlichen Intron.

1.1. Kartierung von pDh 3-A11

Der Klon pDh 3-A11 wurde auf Schnittstellen für die Restriktionsenzyme Ava I, Sst I, Bgl II und Kpn I untersucht (siehe Abbildung 1)

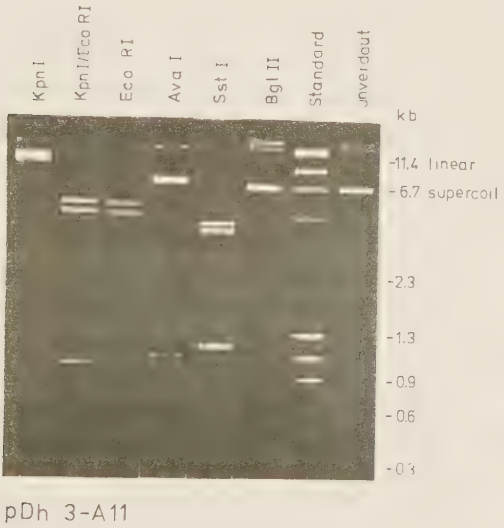


Abbildung 1

Die Abbildung zeigt die Restriktionsfragmente des Klons pDh 3-A11 nach Verdauung mit den darüber angegebenen Enzymen.

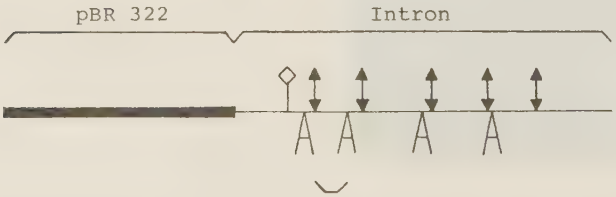
Bgl II hat keine Erkennungssequenz in pDh 3-A11

Kpn I schneidet einmal im Intron direkt neben dem linken 1 kb-Eco-Fragment.

Ava I und Sst I liefern beide jeweils sechs Fragmente von teilweise sehr geringer Größe (zwischen 0.2 und 1.3 kb). Ava I schneidet einmal in pBR 322, Sst I gar nicht, so daß 5 resp. 6 Schnitte im Insert liegen. Selbst durch eine Serie von Doppelverdauungen mit bekannten Enzymen war es nicht möglich, die genauen Schnittstellen und die Reihenfolge der Fragmente für den Bereich rechts neben dem Kpn I-Schnitt festzulegen.

Die folgende Karte zeigt die Schnittstellen der untersuchten Enzyme in pDh 3-A11.

pDh 3-A11

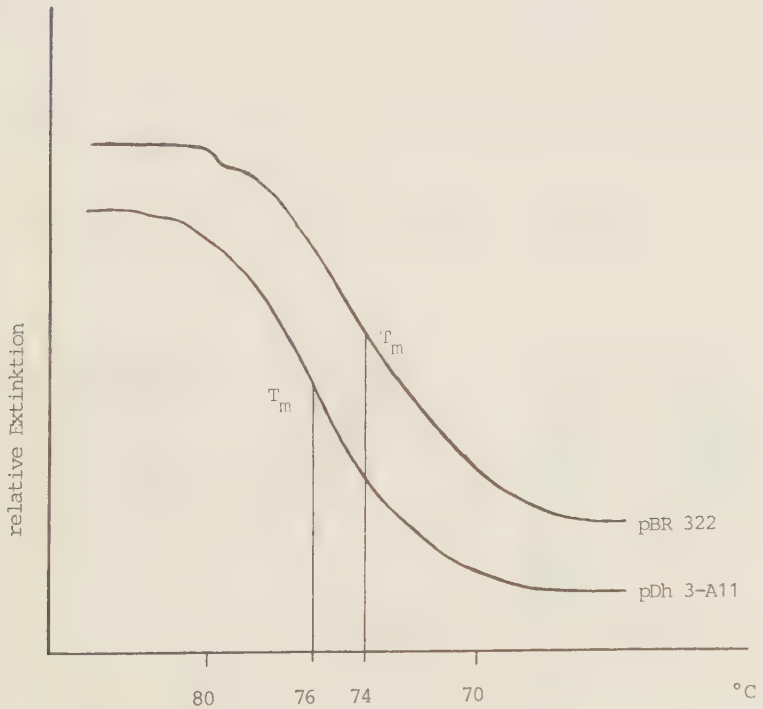


In diesem Bereich liegen noch ein Ava I- und ein Sst I-Schnitt.

1.2. Schmelzkurven von pDh 3-A11

Zur Bestimmung des T_m-Wertes für die optimale Hybridisierungstemperatur und zur Überprüfung des gesamten Schmelzverhaltens wurden vom Intron-Klon pDh 3-A11 in 0.1 x SSC Schmelzkurven aufgezeichnet.

Die folgende Graphik zeigt ein solches Profil mit pBR 322 als Referenz.



Der Klon zeigt ein normales Schmelzprofil ohne steil schmelzende Bereiche. Es gibt also keine Hinweise auf homogene Basenzusammensetzung oder subrepeats.
Der T_m-Wert in 0.1 x SSC liegt bei 76 $\pm$ 0.5 °C.

Die Bestimmung des G+C-Gehaltes erfolgt nach der Formel von Mandel und Marmur (1968), wobei

$$T_m = \frac{G+C}{2.44} + 81.5 + 16.6 \times \log \text{Kationenkonzentration}$$

ist. Daraus resultiert ein G+C-Gehalt von 56 % für den Klon pDh 3-A11.
Der mittlere G+C-Gehalt des Drosophila hydei-Genoms liegt bei 43 % (Renkawitz; 1978).
Die Basenzusammensetzung des Introns weicht also deutlich von der des restlichen Genoms ab.

2. Lokalisation extranukleolärer intronhomologer Sequenzen

2.1. In-situ-Hybridisierungen

Der Intron-Klon pDh 3-A11 wurde mit ^{3}HdTTP radioaktiv markiert und auf Speicheldrüsenpräparate folgender Genotypen hybridisiert:
X^{*}/X^{*}, X^{*}/Y, y m ch/y m ch, y m ch/Y, y m ch/TKS·A, y m ch/A·FP, w lt/w lt, w lt/Y.

Zur Kontrolle wurden Hybridisierungen mit ^{3}HdTTP radioaktiv markierter DNA des Klons pDh 2-A4 durchgeführt. Dieser Klon stammt ebenfalls aus der von R.Renkawitz-Pohl konstruierten Genbank. Er enthält Teile des 18 S rRNA-Gens, den internen transkribierten Spacer, das gesamte 28 S rRNA-Gen ohne Intron und Teile des nicht transkribierten Spacers.

Nach Hybridisierungen mit dem rDNA-Klon pDh 2-A4 ist wie erwartet nur der NO markiert (siehe Abbildung 2 A).

Abbildung 2

Die Abbildung zeigt die NOs von drei Präparaten polytäner Chromosomen nach Hybridisierung mit Tritium-markierter DNA.
A zeigt X^{*}/X^{*} nach Hybridisierung mit rDNA (pDh 2-A4).
B zeigt X^{*}/X^{*} nach Hybridisierung mit Intron-DNA (pDh 3-A11).
C zeigt w lt/Y nach Hybridisierung mit Intron-DNA (pDh 3-A11).

2.1.1. Hybridisierung mit dem Intron-Klon pDh 3-A11 im Bereich des NOs

Hier zeigen die Genotypen mit X-chromosomalem NO (d.h. Genotypen mit den X-Chromosomen X^*, y m ch und w lt) starke Hybridisierung. Sie erstreckt sich jedoch nicht über den gesamten NO, sondern nur über den im zytologischen Präparat anfärbbaren Bereich (siehe Abbildung 2 B).

Bei Genotypen mit einem Y-chromosomalen NO (y m ch/TKS·A und y m ch/A·FP) oder mit beiden Y-chromosomalen NOs (y m ch/Y und w lt/Y) denen der X-chromosomale NO fehlt, findet man keine nukleoläre Hybridisierung (siehe Abbildung 2 C).
Diese Befunde entsprechen den Erwartungen, da bei Drosophila hydei nur X-chromosomale NOs ivs^+ - und ivs^- - Gene, die Y-chromosomalen NOs hingegen fast ausschließlich ivs^- - Gene enthalten.

2.1.2. Hybridisierung mit dem Intronklon pDh 3-A11 außerhalb des NOs

Die Nummerierung der Chromosomen erfolgt nach Berendes (1963).

X-Chromosom
Alle untersuchten Genotypen zeigen hier ausgesprochen starke Hybridisierung, die sich über die gesamte Region von 2 A erstreckt (siehe Abbildung 3 E).

6.Chromosom
Hier zeigen ebenfalls alle untersuchten Genotypen Hybridisierung. Die Markierung ist diffus über fast das gesamte Chromosom verteilt (erscheint allerdings in einigen Präparaten in zwei Banden) und ist schwächer als die X-chromosomale (siehe Abbildung 3 F).

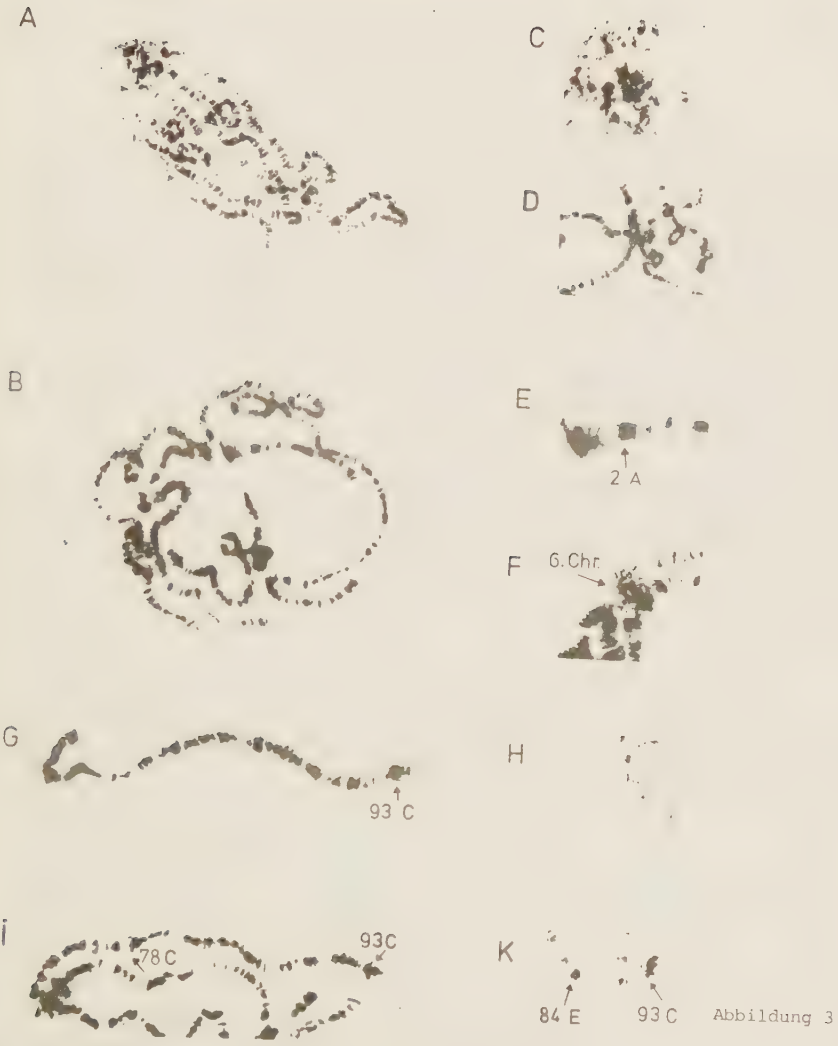


Abbildung 3

Die Abbildung zeigt Präparate von polytänen Chromosomen verschiedener Genotypen nach Hybridisierung mit Tritium-markierter DNA von pDh 2-A4 (A) oder pDh 3-A11 (B-K).

A zeigt X*/X* nach Hybridisierung mit rDNA (pDh 2-A4) ohne Markierung der Chromosomen. B zeigt alle Chromosomen von w lt/Y nach Hybridisierung mit Intron-DNA. C zeigt die Markierung des Chromozentrums, des 6. und des X-Chromosoms von y m ch/y m ch. D zeigt das unmarkierte Chromozentrum, E die Markierung des X-Chromosoms und F die Markierung des 6. Chromosoms von w lt/Y. G-K zeigen jeweils das 4. Chromosom und seine Markierungen: G zeigt w lt/w lt mit der Markierung bei 93 C, H zeigt y m ch/Y·FP ohne Markierung , I zeigt w lt/Y mit Markierung von 93 C und 78 C und K zeigt X*/X* mit Markierung von 93 C und 84 E.

4.Chromosom

Die Hybridisierung im 4.Chromosom ist bei verschiedenen Genotypen unterschiedlich. Die vier Genotypen mit dem y m ch- oder den y m ch-attached-X-Chromosomen zeigen keine Hybridisierung im 4.Chromosom (siehe Abbildung 3 H). Die anderen Genotypen weisen jeweils eine Bande am distalen Ende des Chromosoms bei 93 C auf (siehe Abbilding 3 G,I + K).
Bei X^*/X^* und X^*/Y tritt eine weitere Bande bei 84 E auf (siehe Abbildung 3 K), und w lt/Y zeigt ebenfalls eine zusätzliche Bande, allerdings bei 78 C (siehe Abbildung 3 I).

Die Chromosomen 2, 3 und 5 zeigen niemals Hybridisierung mit pDh 3-A11 (siehe Abbildung 3 B).

Im zytologisch nicht besonders gut identifizierbaren Chromozentrum, welches die unterreplizierten heterochromatischen Anteile der Chromosomen umfaßt, wird nach längerer Exposition Markierung sichtbar, jedoch nur bei Genotypen mit freien X-Chromosomen (siehe Abbildung 3 C und D).

2.2. Dichteposition extranukleolärer intronhomologer Sequenzen im isopyknischen CsCl-Gradienten

Zur Lokalisation extranukleolärer intronhomologer Sequenzen innerhalb von Dichtegradienten wurden mit DNA der Genotypen X^*/X^*, y m ch/y m ch und y m ch/Y isopyknische CsCl-Zentrifugationen durchgeführt und DNA-Fraktionen unterschiedlicher Dichte getrennt analysiert.

Je 1 µg DNA jeder Fraktion wurde mit Hind III verdaut, gelelktrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit ^{32}P-markierter DNA von pDh 3-A11 hybridisiert (siehe Abbildung 4).

Die Autoradiogramme zeigen, daß (bei gleicher DNA-Menge, Hybridisierungsprobe und Expositionszeit) die Hybridisierungsintensität des X^*/X^*-Genotyps etwas stärker ist als die des y m ch/y m ch. Deutlich schwächer gegenüber beiden ist die des y m ch/Y-Genotyps.

Durch Scannen der Autoradiogramme wurde ermittelt, daß der y m ch/y m ch ca. 300 und der X^*/X^* ca. 400 Intronsequenzen mehr besitzt als der y m ch/Y. Das entspricht für y m ch/y m ch ca. 1100, für X^*/X^* ca. 1200 Intronsequenzen im diploiden Genom. Diese zusätzlichen Sequenzen entstammen vermutlich zum größten Teil dem X-chromosomalen Heterochromatin.

In allen Fällen wird eine Zunahme der Hybridisierungsintensität zur schweren, also G+C-reichen Seite des Gradienten beobachtet, die sogar außerhalb des Haupt-DNA-Peaks am größten ist.

Die mittlere Dichte der Fraktionen 11 (y m ch/Y) und 10 (y m ch/y m ch) (siehe Abbildung 4) beträgt 1.712 g/cm³ und entspricht einem G+C-Gehalt von 56 %.

Der aus Schmelzkurven ermittelte G+C-Gehalt des Intron-Klons pDh 3-A11 beträgt ebenfalls 56 %.

Die Restriktionsmuster sind in allen Fraktionen eines Gradienten identisch.

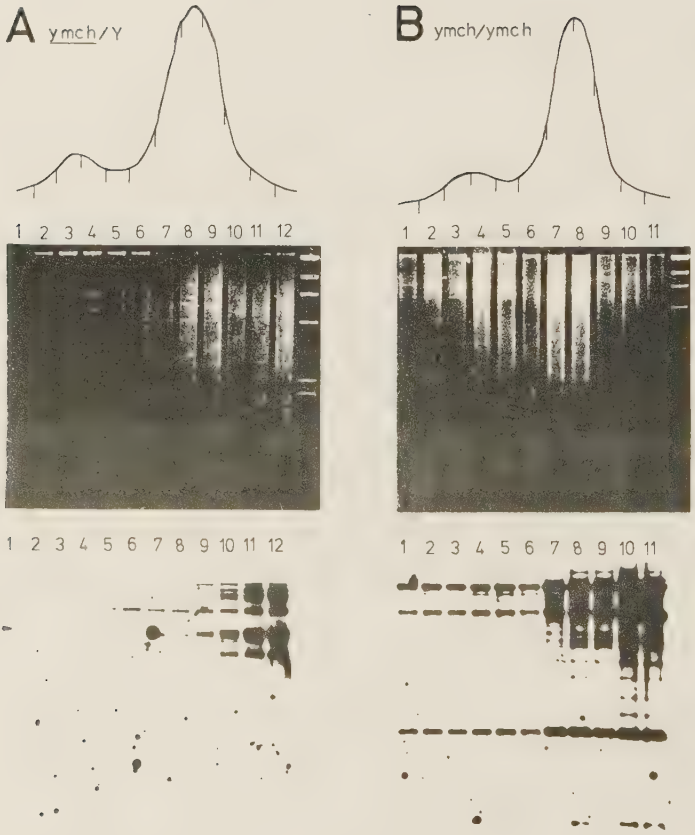


Abbildung 4

Die Abbildung A zeigt den y m ch/Y-Genotyp, B den y m ch/y m ch-Genotyp. Die erste Reihe zeigt jeweils das DNA-Profil nach der Zentrifugation und die einzelnen Fraktionen. Die zweite Reihe zeigt die gelelktrophoretische Auftrennung der Hind-III-Fragmente der einzelnen Fraktionen. Die dritte Reihe zeigt die Autoradiogramme der entsprechenden Gele nach Hybridisierung mit ^{32}P-markierter DNA von pDh 3-A11.

3. Replikationsverhalten bei der Polytänisierung

Es wurde das Verhalten extranukleolärer intronhomologer Sequenzen während der Polytänisierung untersucht.
Dazu wurde DNA aus Ganglien (diploides Gewebe) und Speicheldrüsen (polytänes Gewebe) mit Hind III verdaut und mit ^{32}P-markierter DNA von pDh 3-A11 hybridisiert, und es wurden die Restriktionsmuster miteinander verglichen.
Untersucht wurden Genotypen mit freien X-Chromosomen und damit X-chromosomalem Heterochromatin (X^*/X^*, y m ch/y m ch) und attached-X-Genotypen ohne X-chromosomales Heterochromatin (y m ch/Y) (siehe Abbildung 5).

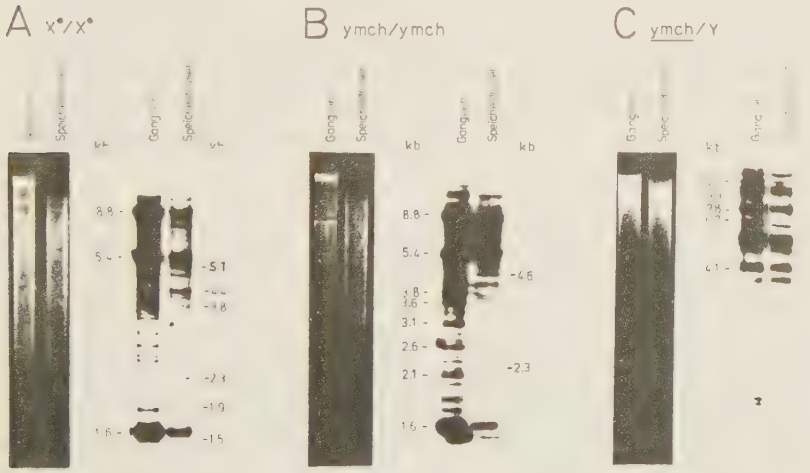


Abbildung 5

Die Abbildung zeigt das Gelphoto von Hind III-verdauter DNA aus Ganglien und Speicheldrüsen (links) und das entsprechende Autoradiogramm nach Hybridisierung mit ^{32}P-markierter DNA von pDh 3-A11 (rechts).
A zeigt den X^*/X^*-Genotyp, B den y m ch/y m ch-Genotyp und C den y m ch/Y-Genotyp.

3.1. Freie X-Chromosomen (X^*, y m ch)

Die Autoradiogramme zeigen ein komplexes Bandenmuster (35 - 40 Banden), welches sich recht gleichmäßig über einen Bereich von 1 bis über 20 kb erstreckt (siehe Abbildung 5). In den Ganglien von X^*/X^* sind außer den starken Banden von 8.8, 5.4 und 1.6 kb, die intronhaltiger rDNA entstammen, alle extranukleolären intronhomologen Banden von ähnlicher Intensität.
Bei y m ch/ y m ch treten Banden von 3.8, 3.6, 3.1, 2.6 und 2.1 kb etwas stärker hervor. Beide Genotypen zeigen in den Speicheldrüsen deutlich weniger Banden (ca. 20), und die allgemeine Hybridisierungsintensität ist schwächer. Außerdem gibt es quantitative und qualitative Unterschiede zwischen den Bandenmustern der beiden Gewebe. Bei X^*/X^* sind Banden von 5.1, 4.4 und 2.3 kb, die in beiden Organen auftreten, in den Speicheldrüsen deutlich stärker als in den Ganglien, bei y m ch/y m ch trifft das allerdings schwächer für die Banden von 4.6 und 2.3 kb zu.
Drei Banden von 3.8, 1.9 und 1.5 kb treten bei X^*/X^* nur in den Speicheldrüsen auf.

Völlig unerwartet war das Auftreten starker intronhaltiger rDNA-Banden in den Speicheldrüsen des X^*/X^*-Genotyps. ivs^+-Gene lassen sich in Speicheldrüsen nur nachweisen, wenn diese mitpolytänisiert werden (Franz et al.; 1983). Danach gibt es eine Gruppe von Genotypen, die ivs^+-Gene nicht polytänisieren. Bei diesen Genotypen liegen im diploiden Zustand genügend ivs^--Gene vor, um bei Polytänisierung das 150-Gen-Niveau ($\hat{=}$ 150 ivs^--Gene pro 2 C pro Speicheldrüsenkern) zu erreichen.

Eine zweite Gruppe von Genotypen besitzt im diploiden Ausgangszustand zu wenig ivs^--Gene, um dieses Niveau zu erreichen und polytänisiert ivs^+-Gene mit. Nach Franz et al. gehört der X^*/X^*-Genotyp (dort als X^7/X^7 bezeichnet) zur ersten Gruppe. Da der Stamm jedoch in meinen Experimenten ivs^--Banden in den Speichel-

drüsen zeigte, müßte er eigentlich zur zweiten Gruppe gehören. Um zu überprüfen, zu welcher der beiden Gruppen der Stamm zum Zeitpunkt meiner Untersuchungen gehörte, wurden am ursprünglichen X^*/X^*-Stamm und an zwei weiteren, aus diesem entstandenen aber getrennt gehaltenen, X^*/X^*-Stämmen folgende Untersuchungen durchgeführt: Speicheldrüsen-DNA wurde mit Eco RI oder Eco RI/ Pst I verdaut und mit rDNA hybridisiert (nach Franz, Kunz;1981). In allen drei Fällen traten die sonst für X^*/X^*-Stämme untypischen ivs^+-Banden auf (siehe Abbildung 6).

Abbildung 6

Die Abbildung zeigt das Verhältnis von ivs^--Genen (dargestellt durch die 5.4 kb-Bande) zu ivs^+-Genen (dargestellt durch die 4.8 kb-Bande) in Speicheldrüsen-DNA von drei getrennt gehaltenen X^*/X^*-Stämmen nach Eco RI/Pst I-Verdauung und Hybridisierung mit rDNA (^{32}P-markierte DNA von pDh 2-A4). 1. zeigt den ursprünglichen 1978 konstruierten Stamm, 2. einen davon seit 1982 getrennt gehaltenen Stamm und 3. den von mir untersuchten Stamm, der seit 1981 vom ursprünglichen Stamm getrennt gehalten wird.

Ivs^+-Gen-Polytänisierung und bobbed-Phänotyp treten dann zusammen auf, wenn im diploiden Zustand so wenig ivs^--Gene vorhanden sind, daß bei voller Polytänisierung das 150-Gen-Niveau sehr stark unterschritten bleibt.
Die von mir hergestellten X^*/O-Tiere zeigten zu 1 % extremen bobbed-Phänotyp.

Aus diesen Befunden mußte geschlossen werden, daß der X^*/X^*-Stamm zum Zeitpunkt meiner Experimente zur Gruppe der Genotypen gehörte, die ivs^+-Gene polytänisieren.
Es muß also innerhalb der rDNA zu Verminderung von ivs^--Genen gekommen sein, vermutlich durch ungleiches cross-over.

3.2. Attached-X-Chromosomen (y m ch/Y)

Im Vergleich zu X^*/X^* und y m ch/y m ch ist beim y m ch/Y-Genotyp bei verminderter Bandenzahl (ca.30) das Verteilungsmuster sehr heterogen (siehe Abbildung 5). Der Bereich von 1 bis über 20 kb wird nicht gleichmäßig abgedeckt, sondern um 10, 5 und 4 kb treten Banden gehäuft auf.

Im Gegensatz zu den beiden anderen Genotypen ist die Hybridisierungsintensität zwischen Ganglien und Speicheldrüsen sehr ähnlich. Außerdem sind die quantitativen und qualitativen Unterschiede anderer Natur: es gibt nur drei Banden von 6.7, 7.8 und 9.9 kb, die nur in den Ganglien auftreten, und zwei Banden von 12 und 4.1 kb, die in den Ganglien geringfügig stärker sind als in den Speicheldrüsen.

Es gibt hier im Gegensatz zu den anderen Genotypen keine Banden, die nur oder stärker in den Speicheldrüsen auftreten.

4. Hybridisierungen mit dem 1 kb Eco-Fragment

W.Kunz hat an verschiedenen attached-X-Genotypen Hind III-Verdauungen durchgeführt und mit dem Intron-Klon pDh 3-A11 hybridisiert. Dabei zeigen alle diese Genotypen vermehrt Banden um 6 kb. Diese Länge entspricht der des Introns wie es auch in der rDNA vorkommt. Die Bandenhäufung geht mit Längenheterogenität um 0.4 kb einher und kann bis zu zwei Drittel der gesamten intronhomologen Sequenzen ausmachen.
Benutzt man zur Hybridisierung nur einen Teil des Introns, den Intron-Subklon, das 1 kb Eco-Fragment (siehe III.1.) so unterscheidet sich das dadurch entstehende Muster bis auf wenige durchweg schwach markierte Banden nicht von dem durch das gesamte Intron hervorgerufene. Das wird als wichtiger Hinweis dafür gewertet, daß intronhomologe Sequenzen tandemartig hintereinander vorliegen. Wenn keine Tandemanordnung vorliegt und die Introns in Fremdsequenzen eingebettet sind, dürften 50 % der intronpositiven Banden nicht mehr mit dem 1 kb Eco-Fragment entdeckt werden.

Die Längenheterogenität wird durch kleinere Deletionen oder Duplikationen hervorgerufen. Deletion des 0.6 kb Hind III-Fragmentes sollten dabei zu einer Bandenhäufung um die doppelte Intronlänge führen. Dies wird auch, allerdings weniger ausgeprägt beobachtet. Die restlichen Banden sind in ihrer Länge deutlich von der einfachen oder doppelten Intronlänge verschieden. Sie hybridisieren jedoch auch alle mit dem 1 kb Eco-Fragment, so daß vermutlich auch diese tandemartig angeordnet sind. Dabei wird die Längenheterogenität wahrscheinlich durch größere Deletionen hervorgerufen.
Für Genotypen mit freien X-Chromosomen, die 300 - 400 Intronsequenzen mehr enthalten als attached-X-Genotypen und von denen ein großer Teil im X-chromosomalen Heterochromatin liegt, wurden nach Hind III-Verdauungen ebenfalls Hybridisierungen mit dem 1 kb Eco-Fragment durchgeführt.

Abbildung 7

Die Abbildung zeigt Autoradiogramme Hind III-verdauter DNA des y m ch/y m ch- und y m ch/Y-Genotyps nach Hybridisierung mit ^{32}P-markierter Intron-DNA.

A zeigt Autoradiogramme nach Hybridisierung mit dem gesamten Intron (pDh 3-A11),
B zeigt Autoradiogramme nach Hybridisierung mit dem Intron-Subklon, dem 1 kb Eco-Fragment.

Die Autoradiogramme zeigen, daß auch bei diesen Genotypen alle durch pDh 3-A11 entstehenden Banden mit dem 1 kb-Eco-Fragment entdeckt werden können (siehe Abbildung 7). Die Hybridisierung ist natürlich sehr viel schwächer, und die Banden erscheinen erst nach ungefähr fünfmal so langer Exposition in gleicher Stärke wie die durch das gesamte Intron hervorgerufenen.
Im Gegensatz zu attached-X-Genotypen wird mit dem 1 kb Eco-Fragment bei X^*/X^* - und y m ch/y m ch auch das 0.6 kb Hind III-Fragment entdeckt. Dies liegt im Intron links neben dem 1 kb Eco-Fragment und ist im Klon dem Fragment nicht homolog. Es handelt sich also um eine stark veränderte extranukleoläre intronhomologe Sequenz. Diese besitzt jetzt Homologie zum 1 kb Eco-Fragment und bandiert im Gel an der Position, an der sich auch die, dem 1 kb Eco-Fragment nicht homologen 0.6 kb Hind III-Fragmente befinden.

5. Charakterisierung klonierter extranukleolärer Intronsequenzen

H.Bünemann hat nach Teilverdauungen mit dem Restriktionsenzym Sau 3A eine Genbank des Drosophila hydei-Männchen-Genoms in λ-EMBL-3-Phagen hergestellt, wobei die DNA-Inserts in die Bam H1-Schnittstellen des Phagen ligiert wurden.

P.Loss hat durch Screening dieser Genbank Klone isoliert, die extranukleoläre intronhomologe Sequenzen enthalten. Durch Hybridisierung identischer Filter mit rDNA (pDh 2-A4) oder Intron-DNA (pDh 3-A11) wurden acht rDNA-freie Klone identifiziert. Diese wurden von mir gereinigt und charakterisiert.

Von den Restriktionsenzymen, deren Schnittstellen im Intron-Klon pDh 3-A11 bekannt sind, wurden Sal I, Eco RI, Hind III, Bam H1, Xba I und Kpn I als die günstigsten für die Kartierung der rekombinanten λ-EMBL-3-Phagen eingesetzt.

Die intronhomologen Bereiche wurden durch Hybridisierung mit ^{32}P-markierter DNA von pDh 3-A11 bestimmt.

Es wurden folgende acht Klone, die wegen der Verwechslungsgefahr bei reiner Zahlennomenklatur individuell benannt wurden, untersucht:

Aladin, Agamemnon, Cleopatra, Holzbock, Kalliope, Nemesis, Penelope und Ramses.

Am Beispiel von Penelope soll der Kartierungsvorgang demonstriert werden.

Gelphotos und Autoradiogramme zeigt Abbildung 8.

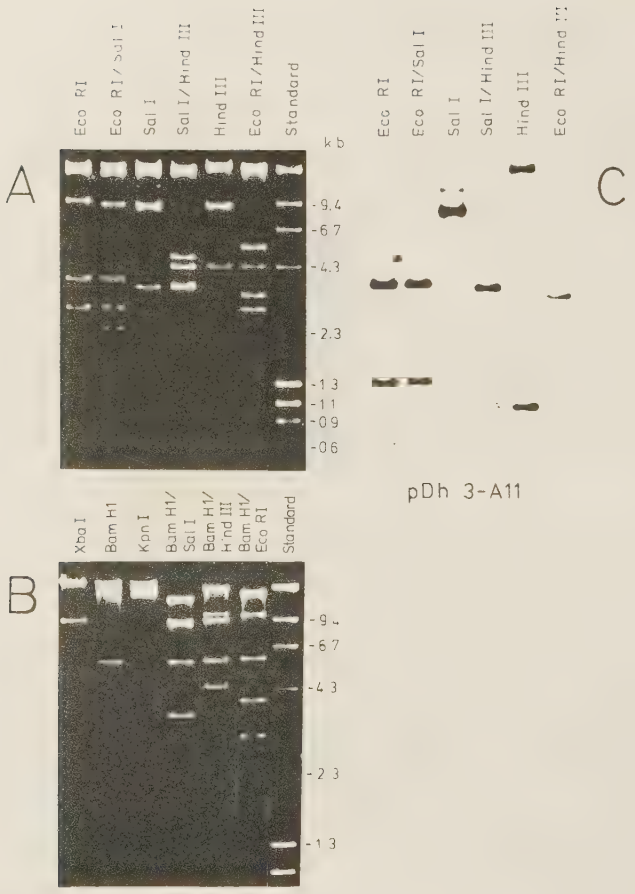
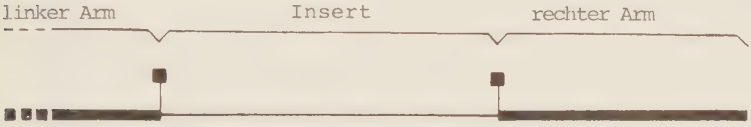


Abbildung 8

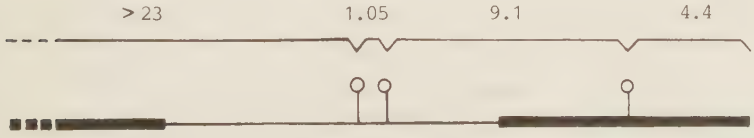
Die beiden Gelphotos (A und B) zeigen Restriktionsfragmente von Penelope nach Verdauung mit den darüber angegebenen Enzymen. Das Autoradiogramm (C) stammt vom Gel A und zeigt die intronpositiven Fragmente von Penelope nach Hybridisierung mit ^{32}P-markierter DNA von pDh 3-A11.

5.1. Kartierung von Penelope

Sal I ( ) schneidet aus den Armen das Insert heraus und liefert vier Fragmente von 19.4, 9.2, 8.9 und 3.45 kb. Davon ist das 19.4 kb-Fragment der linke, das 9.2 kb-Fragment der rechte Arm. Das Insert wird durch einen Sal I-Schnitt in zwei Fragmente von 8.9 und 3.45 kb zerlegt. Die gesamte Insertlänge beträgt also 12.35 kb.

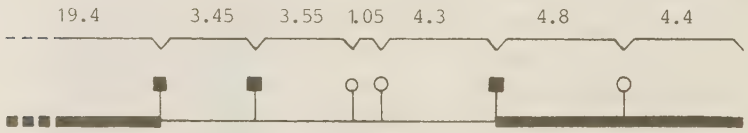


Hind III ( ) liefert ebenfalls vier Fragmente von >23, 9.1, 4.4 und 1.05 kb. Das 4.4 kb-Fragment stammt aus dem rechten Arm. Da kein weiterer Hind III-Schnitt im Arm existiert und bis zum Beginn des Inserts noch 4.8 kb Arm folgen, muß sich das 9.1 kb-Fragment , aus 4.8 kb Arm und 4.3 kb Insert bestehend, anschließen. Das 1.05 kb-Fragment muß reines Insert-Fragment sein und auf das 9.1 kb-Fragment folgen. Da die Insertlänge durch Sal I mit 12.35 kb bestimmt wurde, muß das verbleibende >23 kb-Fragment aus dem linken Arm und 7 kb Insert zusammengesetzt sein.

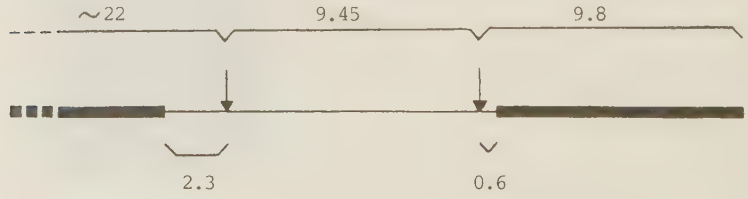


Durch die eindeutige Festlegung der Hind III-Schnitte kann durch Sal I/Hind III-Doppelverdauung die Position des Sal I-

Schnittes im Insert bestimmt werden. Diese Verdauung liefert die Arm-Fragmente von 19.4, 4.8 und 4.4 kb und vier Insert-Fragmente von 4.3, 3.55, 3.45 und 1.05 kb. Diese können nur entstehen, wenn der Sal I-Schnitt 3.45 kb vom linken Arm entfernt liegt.



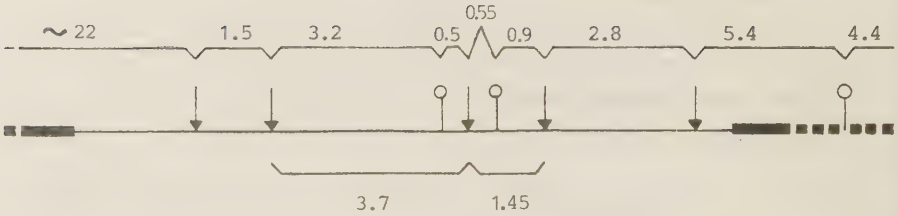
Eco RI (↓) schneidet den Klon in 6 Fragmente von ~22, 9.8, 3.7, 2.8, 1.5 und 1.45 kb. Der Klon enthält also fünf Eco RI-Schnitte, von denen die beiden äußeren zu den Armen liegenden direkt festgelegt werden können. Das 9.8 kb-Fragment enthält den rechten Arm und 0.6 kb Insert. Die Gesamtlänge der vier Insert-Fragmente beträgt 9.45 kb. Zusammen mit dem am rechten Arm hängenden 0.6 kb-Fragment werden 10.05 kb erreicht, so daß der zum linken Arm liegende Eco RI-Schnitt 2.3 kb vom Insert-Ende entfernt liegt.



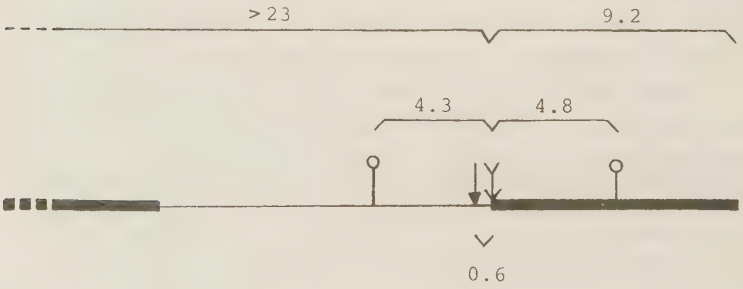
Die Reihenfolge der verbleibenden Insert-Fragmente kann nur durch Doppelverdauungen festgelegt werden.
Eco RI/Sal I-Doppelverdauungen liefern sieben Insert-Fragmente von 3.7, 2.8, 2.3, 1.45, 1.15, 0.6 und 0.35 kb. Die Fragmente von 2.3 und 0.6 kb bestätigen die festgelegten äußeren Eco RI-Schnitte. Da ein Sal I-Schnitt im Insert liegt, muß ein Eco RI-

Fragment dadurch zerschnitten werden. Neben drei unangetasteten Eco RI-Fragmenten von 3.7, 2.8 und 1.45 kb entstehen zwei neue Fragmente von 1.15 und 0.35 kb. Diese können nur entstehen, wenn vom linken Arm ausgehend der zweite Eco RI-Schnitt 1.5 kb vom ersten entfernt liegt.

Die verbleibenden zwei Eco RI-Schnitte werden durch Eco RI/Hind III-Doppelverdauungen festgelegt.
Das größte Fragment enthält den linken Arm und 2.3 kb Insert bis zum ersten Eco RI-Schnitt. Das 4.4 kb-Fragment ist das reine Hind III-Arm-Fragment. Das 5.4 kb Fragment umfaßt den Rest des rechten Arms und 0.6 kb Insert bis zu dem ersten Eco RI-Schnitt rechts. Die weiteren Insert-Fragmente sind 3.2, 2.8, 1.5, 0.9, 0.55 und 0.5 kb.
Eco RI alleine liefert reine Insert-Fragmente von 3.7, 2.8, 1.45 und 1.5 kb, Hind III alleine nur das 1.05 kb-Fragment. Letzteres verschwindet bei der Doppelverdauung durch einen Eco RI-Schnitt ebenso wie die Eco RI-Fragmente von 3.7 und 1.45 kb durch jeweils einen Hind III-Schnitt. Die neu auftretenden Fragmente können nur entstehen, wenn das 1.05 kb-Fragment durch einen Eco RI-Schnitt ungefähr in der Mitte in 0.55 und 0.5 kb zerlegt wird. Von dort ausgehend muß das 3.7 kb Eco RI-Fragment nach links bis zum zweiten Eco RI-Schnitt liegen, wobei es von Hind III auf 3.2 kb verkürzt wird. Das 1.45 kb-Fragment muß von dem Eco RI-Schnitt in der Mitte des 1.05 kb-Fragmentes ausgehend nach rechts liegen und wird von Hind III in 0.55 und 0.9 kb zerlegt.



Durch Xba I ( ) entstehen nur zwei Fragmente von >23 und 9.2 kb. Es liegt also nur ein Xba I-Schnitt im Insert vor und zwar direkt am rechten Insert-Ende.
Xba I/Hind III-Doppelverdauungen bestätigen diese Deutung: das 9.1 kb Hind III-Fragment wird in 4.8 kb Arm und 4.3 kb Insert zerschnitten.
Eco RI/Xba I-Doppelverdauungen liefern ein 0.6 kb-Fragment, wie es auch bei Eco RI/Sal I-Doppelverdauungen entsteht, was bedeutet, daß der Xba I-Schnitt im Insert direkt neben dem Sal I-Schnitt des rechten Arms liegen muß.



Durch Kpn I ( ) enstehen nur Arm- und Arm/Insert-Fragmente. Es gibt keinen Schnitt im Insert.
Bam H1 ( ) zeigt ein völlig unerwartetes Ergebnis. Es entstehen zwei Fragmente von 5.6 und >23 kb. Bam H1 schneidet nicht in den Armen von λ-EMBL-3-Phagen, höchstens an einer

rekonstruierten Klonierungsstelle oder im Insert. Wenn das 5.6 kb-Fragment aus dem Insert stammt, müßten insgesamt drei Fragmente auftreten. Die Vermutung, daß durch ungenügendes Erhitzen die Arm-Fragmente aneinander hängengeblieben sind, wurde durch Doppelverdauungen mit Bam H1/Eco RI und Bam H1/ Sal I widerlegt. Dabei entstehen immer die durch einfache Verdauung bekannten Fragmente. Zusätzlich tritt das 5.6 kb-Fragment auf, einhergehend mit einer Verkürzung des linken Arms um genau diese Länge. Das legt die Vermutung nahe, daß kein Bam H1-Schnitt im Insert vorliegt sondern daß es sich um einen Schnitt im linken Arm handelt.

Neben dieser Abweichung ist bei vier weiteren Klonen der rechte Arm 10.5 kb lang (statt 9.2 kb) und enthält drei Bam H1-Schnitte. Der Vergleich der Positionen dieser Schnittstellen und die veränderte Arm-Länge ergeben eine völlige Übereinstimmung mit dem λ -Phagen Charon 4A.

Es handelt sich bei den von mir untersuchten Klonen also nicht um reine λ -EMBL-3-Klone, dies sind nur Holzbock, Nemesis und Cleopatra, sondern es existieren ein reiner Charon 4A-Klon - Agamemnon - und vier Chimären. Von denen besitzen Aladin, Penelope und Ramses links Charon 4A-Arme und rechts λ -EMBL-3-Arme, Kalliope hat rechts den Charon 4A-Arm und links den λ -EMBL-3-Arm.

Durch Hybridisierung von ^{32}P-markierter DNA von pDh 3-A11 mit Fragmenten von Penelope aus einfachen Verdauungen und Doppelverdauungen mit Eco RI, Sal I und Hind III wurde der intronhomologe Bereich des Klons bestimmt. Dieser umfaßt die beiden Eco RI-Fragmente von 3.7 und 1.45 kb.

Die folgende Karte faßt noch einmal alle Schnittstellen des Inserts von Penelope zusammen. Der intronhomologe Bereich ist hervorgehoben.

5.2. Beschreibung und Restriktionskarten der anderen Klone

Zwei der acht Klone - Cleopatra und Aladin - zeigen das gleiche Restriktionsmuster wie pDh 3-A11. Dieser Bereich zeigt auch die Hybridisierungshomologie. Bei Aladin entspricht diese Länge dem Intron der rDNA, bei Cleopatra ist er länger und das 0.6 kb Hind III-Fragment ist zweimal vorhanden.
In allen anderen Fällen ist die Homologie zum Intron hauptsächlich durch Hybridisierung festzustellen. Dabei ist die Hybridisierungsintensität meist schwächer als bei Cleopatra und Aladin, und die Restriktionsmuster sind völlig verändert.

Penelope und Holzbock zeigen gleichartige Muster im intronhomologen Bereich. Auch das Eco RI- und Xba I-Muster der anschließenden Sequenz ist das gleiche. Möglicherweise handelt es sich bei diesen um überlappende Klone.

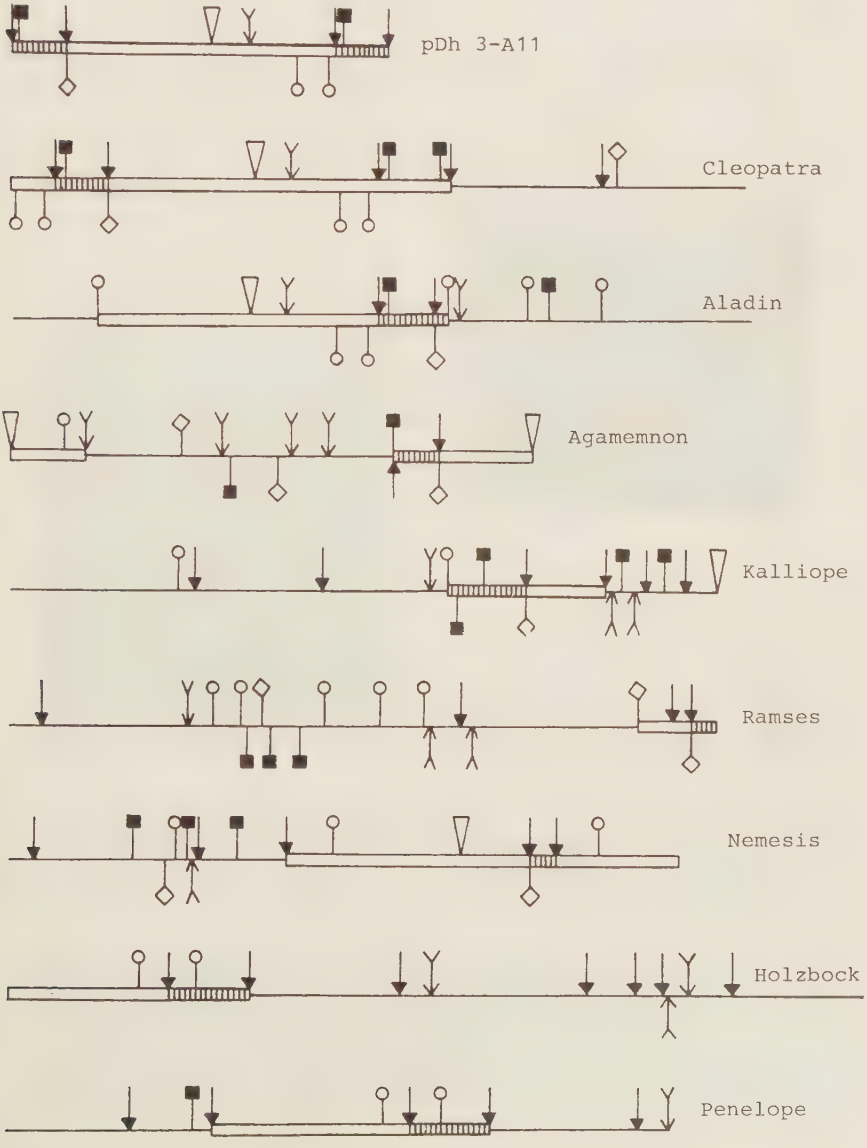
Die Länge der intronhomologen Bereiche ist sehr unterschiedlich. In allen Klonen findet man außerdem immer Sequenzen, die nicht mit pDh 3-A11 hybridisieren. In einigen Fällen übersteigt der Anteil solcher Fremdsequenzen den der intronhomologen um ein Beträchtliches (besonders bei Ramses und Holzbock).

In einem Klon - Agamemnon - gibt es zwei intronhomologe Bereiche, die durch 5.7 kb Fremdsequenz voneinander getrennt sind.

Auffällig oft ist trotz der massiven Veränderungen des Restriktionsmusters ein Abschnitt des Introns konserviert. Dieser liegt im Intron der rDNA neben dem 1 kb Eco-Fragment rechts zum ß2-Segment der 28 S rRNA und ist durch sehr nah beieinander liegende Schnittstellen der Enzyme Eco RI und Kpn I charakterisiert.

Verdauungen mit Eco RI oder Eco RI/Sal I und Hybridisierungen mit ^{32}P-markierter DNA des 1 kb Eco-Fragmentes zeigen, daß alle Klone, auch die mit völlig verändertem Restiktionsmuster, Homologie zu diesem Fragment besitzen (siehe Abbildung 9). Dabei ist - außer bei Nemesis - die Hybridisierungsintensität gleich.

Die folgende Graphik zeigt die Restriktionsmuster der untersuchten Klone. Der intronhomologe Bereich ist hervorgehoben und die darin enthaltene Homologie zum 1 kb Eco-Fragment ist schraffiert. 0.5 cm entspricht 1 kb.



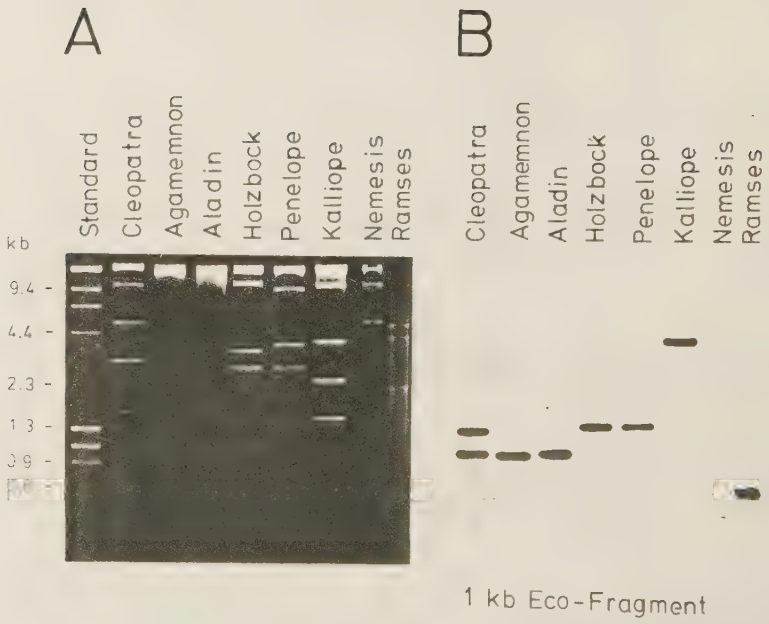


Abbildung 9

Das Gelphoto A zeigt die Restriktionsfragmente von acht untersuchten Intron-Klonen nach Verdauung mit Eco RI (Cleopatra, Agamemnon, Aladin, Holzbock, Penelope, Kalliope) oder Eco RI/Sal I (Nemesis, Ramses). Das Autoradiogramm B stammt vom Gel A und zeigt die intronpositiven Fragmente nach Hybridisierung mit dem Intron-Subklon, dem 1 kb Eco-Fragment.

Die Fremd-DNA, die die intronhomologen Bereiche flankiert, zeigt untereinander keine Gemeinsamkeiten im Restriktionsmuster - mit Ausnahme der überlappenden Klone Holzbock und Penelope -.

Um zu überprüfen, ob trotzdem Hybridisierungshomologie vorhanden ist, wurde ein ^{32}P-markierter Klon mit den anderen hybridisiert. Die Klone wurden so verdaut, daß Arm-Fragmente und intronhomologe Bereiche von den Fremdsequenzen getrennt wurden, was zu einer Vielzahl von Fragmenten führte. Die Auswertung der

Autoradiogramme wurde wegen der großen Zahl der Fragmente und der starken Homologie der Arme und der Intronsequenzen sehr schwierig. Trotzdem konnte die Hybridisierung von Holzbock mit den anderen Klonen zeigen, daß - außer dem überlappenden Bereich - auch andere Fremdsequenzen von Holzbock und Penelope einander teilhomolog sind (siehe Abbildung 10).

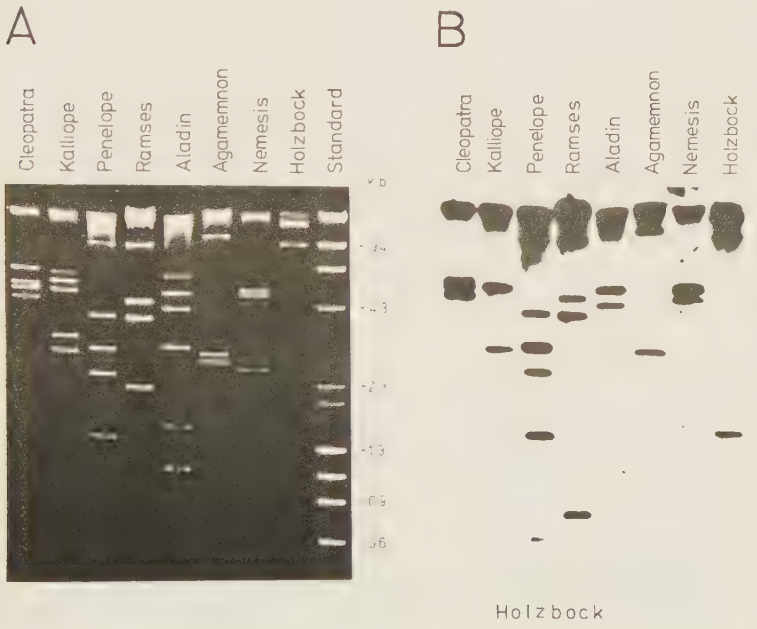


Abbildung 10

Das Gelphoto A zeigt die Restriktionsfragmente der acht untersuchten Klone nach Verdauung mit Hind III/Sal I (Cleopatra, Kalliope, Aladin,Nemesis), Eco RI/Sal I (Penelope, Ramses), Xba I/Sal I (Agamemnon) und Kpn I (Holzbock). Das Autoradiogramm B stammt vom Gel A und zeigt Hybridisierung mit ^{32}P-markierter DNA von Holzbock.

Da schwächere Homologie zu anderen Klonen nicht ausgeschlossen werden konnte und nicht entscheidbar war, welcher Teil der Fremdsequenzen von Holzbock die Homologie zu Penelope beinhaltet, wurden zur weiteren Analyse der Fremdsequenzen Subklone in pBR 322 konstruiert.

6. Subklonierung der Fremdsequenzen

Wegen der Selektionsmöglichkeit auf Ampicillin- und Tetracyclinresistenz bei Klonierung in pBR 322 wurden bevorzugt Sal I-Fragmente der Fremdsequenzen subkloniert (Nemesis, Kalliope, Ramses, Agamemnon, Aladin).

Da Holzbock keine Sal I-Schnitte enthält, wurden dessen Fremdsequenzen in Eco RI subkloniert.

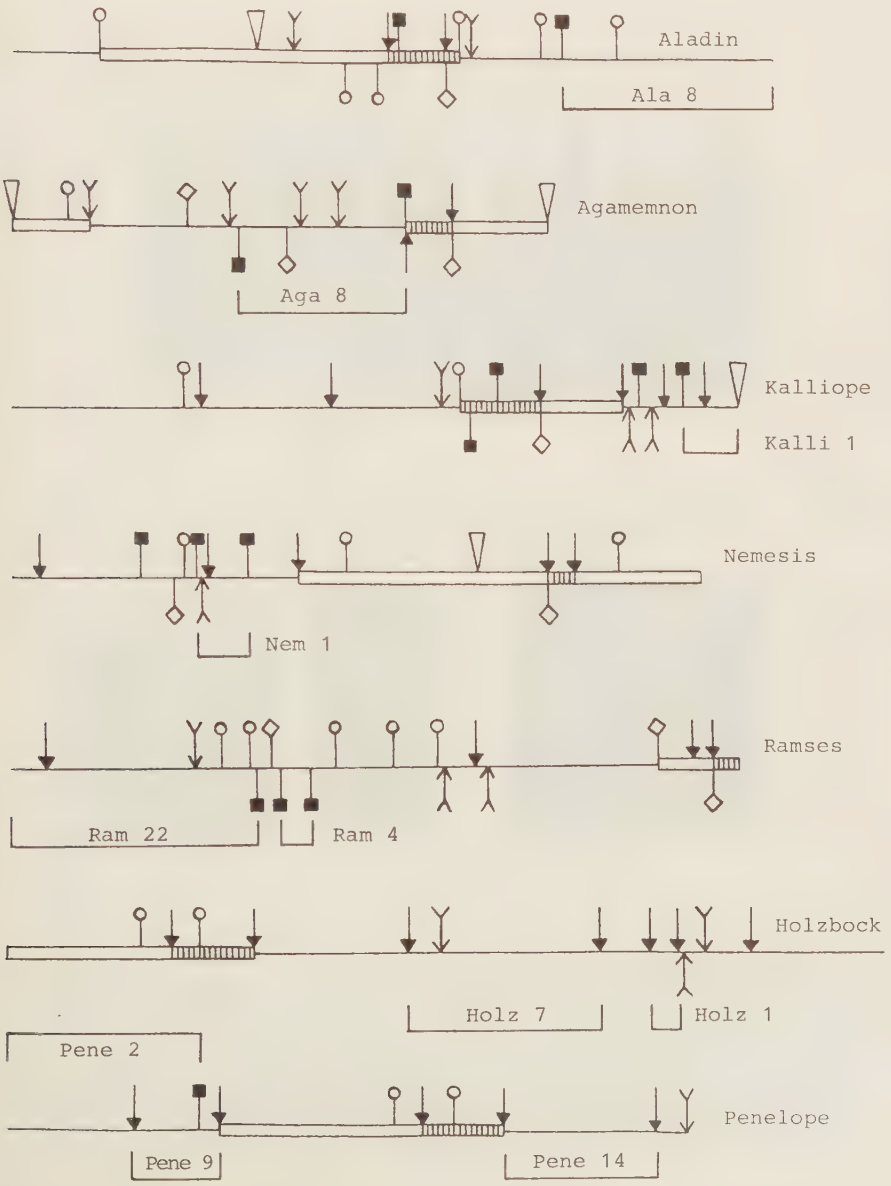
Von Penelope wurden sowohl Sal I- als auch Eco RI-Fragmente subkloniert.

Nach DNA-Minipräparationen wurde anhand der Fragmentlängen von "supercoil" und "open circle" auf Gelen abgeschätzt, welches Fragment subkloniert war. Von den infrage kommenden Klonen wurden dann größere Mengen DNA isoliert. Diese wurden mit Sal I oder Eco RI verdaut und neben den Ausgangsklonen auf Gelen aufgetrennt (siehe Abbildung 11).

6.1. Hybridisierung der Subklone mit den λ-Phagen-Klonen

Die Subklone wurden mit ^{32}P-radioaktiv markiert und mit den Eco RI- oder Sal I-Fragmenten aller Klone hybridisiert.
Die Autoradiogramme (siehe Abbildung 12) zeigen zwei Klassen von Subklonen.
Die eine weist keine Homologie zu anderen Fremdsequenzen auf. Dazu gehören Nem 1, Aga 8, Ala 8, Kalli 1 und Ram 4.
Zur zweiten Klasse gehören Ram 22 und alle Holzbock- und Penelope-Subklone. Diese hybridisieren alle mehr oder weniger stark untereinander und zum Teil auch schwach mit Fremdsequenzen von Cleopatra und Kalliope.

Die folgende Graphik zeigt die Klone und in den eckigen Klammern die subklonierten Fragmente. 0.5 cm entspricht 1 kb.



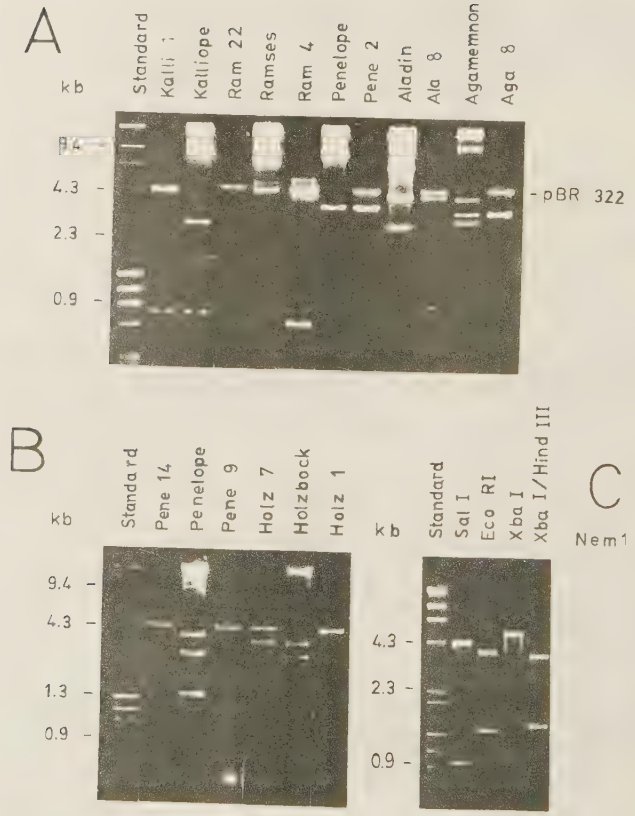


Abbildung 11

Die Abbildung zeigt die Restriktionsfragmente der Intron-Klone und der daraus hergestellten Subklone.
A zeigt die Sal I-Fragmente der Subklone neben den ebenfalls mit Sal I verdauten Ausgangsklonen.
B zeigt die Eco RI-Fragmente der Subklone neben den ebenfalls mit Eco RI verdauten Ausgangsklonen.
C zeigt die Restriktionsfragmente von Nem 1 nach Verdauung mit den darüber angegebenen Enzymen.

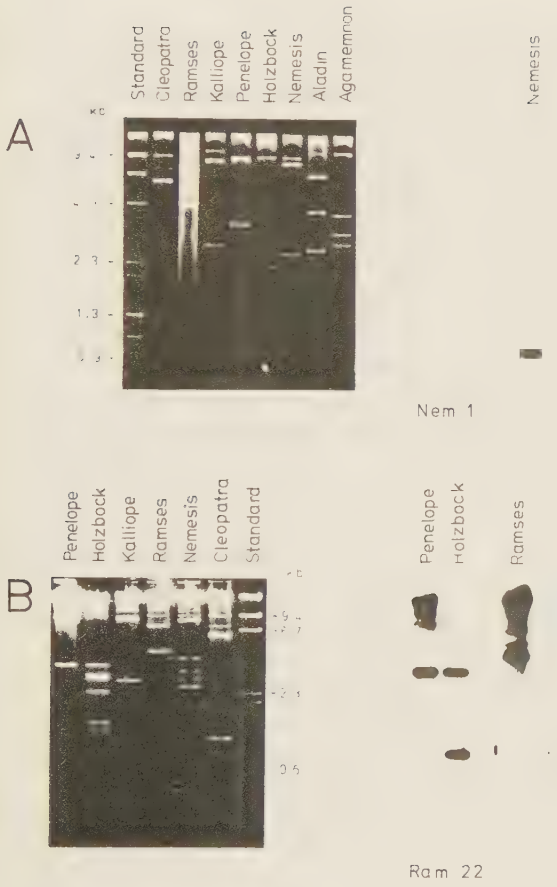


Abbildung 12

Die Abbildung zeigt links die gelelektrophoretische Auftrennung der Restriktionsfragmente der Intron-Klone und rechts die entsprechenden Autoradiogramme nach Hybridisierung mit ^{32}P-markierter Subklon-DNA.
A zeigt Sal I-Verdauungen und Hybridisierung mit Nem 1.
B zeigt ebenfalls Sal I-Verdauungen und Eco RI/Sal I-Verdauungen (Holzbock) und Hybridisierung mit Ram 22. Die starke Hybridisierung im hochmolekularen Bereich ist auf Teilverdauung und ungenügendes Erhitzen der DNA-Proben zurückzuführen.

6.2. Hybridisierung der Subklone mit genomischer DNA

Die Autoradiogramme genomischer DNA von X^*/X^*, y m ch/y m ch und y m ch/Y nach Sal I- oder Eco RI-Verdauung und Hybridisierung mit ^{32}P-markierter Subklon-DNA (siehe Abbildung 13) zeigen alle - außer mit Nem 1 - einen mehr oder weniger hochmolekularen Schmier. Bei Aga 8 und in noch geringerem Maß bei Pene 14 und Holz 7, wo sich einige schwache Banden über dem Schmier ausmachen lassen, sind sonst keine Banden identifizierbar.

Hybridisierung mit Nem 1 zeigt in allen Genotypen eine starke Bande bei 0.9 kb, entsprechend der Länge des subklonierten Sal I-Fragmentes. Bei y m ch/y m ch ist daneben noch eine schwächere Bande von 1.9 kb sichtbar. Da im Ausgangsklon Nemesis neben der Sequenz von Nem 1 ein Sal I-Fragment von 1 kb liegt, wird angenommen, daß es sich bei dieser Bande um ein Teilverdauungsprodukt handelt.

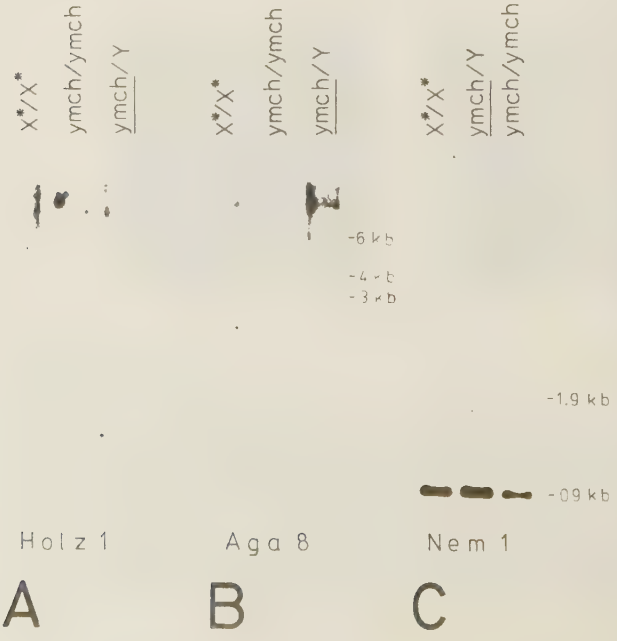


Abbildung 13

Die Abbildung zeigt mit drei Autoradiogrammen die Hybridisierung von ^{32}P-markierter Subklon-DNA mit genomischer DNA der Genotypen X^*/X^*, y m ch/y m ch und y m ch/Y.

A zeigt die Hybridisierung von Holz 1 mit Eco RI-verdauter DNA.

B zeigt die Hybridisierung von Aga 8 mit Sal I-verdauter DNA.

C zeigt die Hybridisierung von Nem 1 mit Sal I-verdauter DNA.

6.3. In-situ-Hybridisierung mit den Subklonen

Die Subklone Kalli 1, Ala 8, Ram 4, Aga 8, Holz 7, Nem 1, Pene 9 und Ram 22 wurden mit Tritium radioaktiv markiert und auf Speicheldrüsenpräparate von X^*/X^*, y m ch/y m ch und y m ch/Y hybridisiert (siehe Abbildung 14).

Dabei konnten keine Unterschiede zwischen den Genotypen festgestellt werden.

Kalli 1 und Ram 4 lassen keine spezifischen Hybridisierung erkennen.

Ala 8 hybridisiert nur im 4. Chromosom bei 93 C. Die Hybridisierungsintensität deutet darauf hin, daß dort nur wenige Kopien dieser Sequenz vorliegen, möglicherweise sogar nur eine.

Aga 8 hybridisiert stark im X-Chromosom bei 1 A, 1 B und 2 A. Diese Sequenz ist dort mehrfach vorhanden.

Pene 9, Holz 7 und Ram 22, die Subklone, die untereinander Homologie aufweisen, sowie Nem 1 hybridisieren sehr stark im Chromozentrum und an den kinetochornahen Enden aller Chromosomen. Diese Sequenzen sind auch mehrfach im Genom vertreten. Nach längerer Expositionszeit findet man einige schwache Banden im Euchromatin.

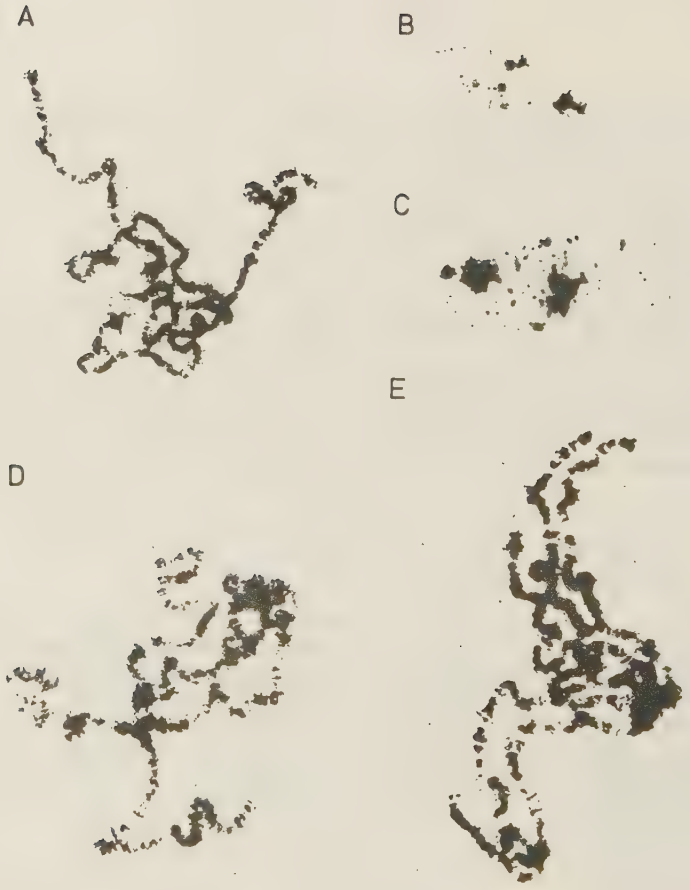


Abbildung 14

Die Abbildung zeigt Präparate polytäner Chromosomen des X^*/X^*-, y m ch/y m ch- und y m ch/Y-Genotyps nach in-situ-Hybridisierung mit ^{3}H-markierter DNA von verschiedenen Subklonen.
A zeigt X^*/X^* nach Hybridisierung mit Ram 4.
B zeigt das 4. Chromosom von y m ch/y m ch nach Hybridisierung mit Ala 8.
C zeigt das X-Chromosom von y m ch/Y nach Hybridisierung mit Aga 8.
D zeigt X^*/X^* nach Hybridisierung mit Nem 1.
E zeigt y m ch/y m ch nach Hybridisierung mit Ram 22.

IV. DISKUSSION

1. Lokalisation intronhomologer Sequenzen in Nukleolus und im Heterochromatin

Die rDNA von Drosophila hydei liegt auf den Geschlechtschromosomen. Es gibt einen X-chromosomalem und zwei Y-chromosomale NOs (Hennig et al.;1975; Kunz, Schäfer; 1976). In-situ-Hybridisierungen mit Intron-DNA zeigen nur über dem X-chromosomalen NO Markierung und haben damit die aus genetischen Analysen gewonnene Vermutung bestätigt, daß die beiden Y-chromosomalen NOs der untersuchten Genotypen frei von ivs^+ -Genen sind.

Bei Drosophila melanogaster existiert ein X-chromosomaler und ein Y-chromosomaler NO (Ritossa et.al.; 1966). Hier ist der Y-chromosomale NO nur frei von type I Introns (Wellauer et al.; 1978), die zu Drosophila hydei-Introns teilweise homolog sind. Dagegen findet man type II Introns auch im Y-chromosomalen NO in ca. 15 % aller rRNA-Gene.

Das ivs^+ -Gen-Cluster des X-chromosomalen NOs von Drosophila hydei (Renkawitz-Pohl et al.; 1981) ist auch im zytologischen Präparat erkennbar. Die Hybridisierung befindet sich über dem gut anfärbbaren Bereich des NOs. Dieser stellt kondensiertes Heterochromatin dar, in dem keine Transkriptionsaktivität nachweisbar ist. Die Lokalisation von ivs^+ -Genen im inaktiven Heterochromatin läßt sich gut mit anderen Evidenzen vereinbaren, daß diese Gene bei Drosophila hydei nicht transkribiert werden (Glätzer; 1979; Franz,Kunz; 1981).

Ähnliche Untersuchungen an Calliphora erythrocephala haben gezeigt zeigt, daß auch dort die ivs^+ -Gene im Heterochromatin des NOs gehäuft vorkommen (Beckingham, Rubacha; 1984). Die Organisation der ivs^+ -Gene von Drosophila melanogaster ist unklar. Frühere Untersuchungen lieferten Hinweise, daß ivs^+ -Gene mit ivs^- -Genen abwechselnd im NO vorliegen (Pellegrini et al.; 1977; Wellauer et al.; 1978). Spätere Daten deuten jedoch darauf hin, daß auch

bei Drosophila melanogaster ivs$^+$ -Gene (mit major type I Introns) aneinandergereiht vorliegen (Sharp et al.; 1983). Allerdings herrscht aufgrund anderer Untersuchungen jüngeren Datums mit erneuten gegenteiligen Befunden (Hawley, Tartof; 1983) nach wie vor Unsicherheit über die tatsächliche Situation.

Sequenzanalysen der ivs$^+$ - und ivs$^-$ -Gene von Drosophila melanogaster und Calliphora erythrocephala haben gezeigt, daß der einzige Unterschied zwischen diesen Genen im Intron selbst liegt (Long; 1981; Mandal, Dawid; 1981; Smith, Beckingham; 1984): Transkriptionsbeginn und -ende unterscheiden sich nicht, und im zellfreien Transkriptionssystem werden beide Gene von Polymerase I in gleichen Mengen transkribiert (Kohorn, Rae; 1982). Das läßt die Vermutung zu, daß die Inaktivität der ivs$^+$ -Gene in einer veränderten Chromatinstruktur begründet liege.

Die Teile des NOs, die zu inaktivem Heterochromatin kondensiert werden, lassen sich im zytologischen Präparat gut anfärben. Untersuchungen an Drosophila hydei (meine Experimente) und Calliphora erythrocephala (Beckingham, Rubacha; 1984) zeigen, daß nur dort Hybridisierung mit Intronsequenzen auftritt. Es bleibt ungewiß, ob die Kondensation von ivs$^+$ -Genen zu Heterochromatin durch die Intronsequenzen selbst hervorgerufen wird. Bei Drosophila melanogaster wurde ein Protein beschrieben, das spezifisch an A+T-reiche Satelliten-Sequenzen bindet (Levinger, Varshavsky; 1982). Möglicherweise wird die Kondensation von ivs$^+$ -Genen ebenfalls durch die Bindung eines intronspezifischen Proteins hervorgerufen.

Bei Drosophila hydei zeigen alle Genotypen, die noch X-chromosomales Heterochromatin enthalten (nicht nur das kinetochornahe), neben der Hybridisierung im NO auch Markierung des Chromozentrums. Diese wird erst nach längerer Expositionszeit sichtbar, was darauf schließen läßt, daß die dort befindlichen Sequenzen unterrepliziert sind. Bei Drosophila melanogaster konnte durch in-situ-Hybridisierungen an mitotischen Chromosomen gezeigt werden, daß auch dort intronhomologe Sequenzen außerhalb des NOs im

X-chromosomalen Heterochromatin liegen (Peacock et al.; 1981).

Es ist bekannt, daß auch Nicht-rDNA (z.B. Satelliten-Sequenzen) mit in den NO hineingezogen wird (Peacock et al.; 1978). Es ist also möglich, daß die nukleoläre Hybridisierung bei Drosophila hydei nicht allein durch die Intronsequenzen der ivs^+ -Gene hervorgerufen wird, sondern auch zum Teil durch extranukleoläre Sequenzen des X-chromosomalen Heterochromatins.

Genotypen mit attached-X-Chromosomen zeigen weder Hybridisierung im NO noch im Chromozentrum - auch nicht nach Überexposition. Es liegen also keine extranukleolären Intronsequenzen im kinetochornahen Heterochromatin des X-Chromosoms, im Y-Chromosom oder im Heterochromatin der Autosomen, sondern nur im mehr distal gelegenen Heterochromatin des X-Chromosoms.

2. Lokalisation intronhomologer Sequenzen im Euchromatin

Neben der Markierung der Chromozentren und der NOs, die nur in Genotypen mit freien X-Chromosomen gefunden wird, zeigen alle untersuchten Genotypen eine auffallend starke Bande im Euchromatin des X-Chromosoms. Diese macht ca. 80 - 90 % der gesamten euchromatischen Intron-Hybridisierung aus. Sie umfaßt die Region 2 A und ist so stark, daß hier mehr als eine intronhomologe Sequenz vorhanden sein muß. Die Hybridisierung im 6. Chromosom ist wie die X-chromosomale allen Genotypen gemeinsam, aber schwächer.

Das punktförmige Chromosom 6 von Drosophila hydei ist dem punktförmigen Chromosom 4 von Drosophila melanogaster zumindest teilweise homolog, was Art und Ort der dort gefundenen Gene angeht (Spencer; 1949; Hochmann; 1978). Im Euchromatin dieses 4. Chromosoms von Drosophila melanogaster findet man Homologie zu Intronsequenzen der rDNA (Peacock et al.; 1981). Daß diese Sequenzen sowohl im 4. Chromosom von Drosophila melanogaster als auch im 6. Chromosom von Drosophila hydei vorkommen, zeigt, daß es neben den Genhomologien weitere strukturelle Gemeinsamkeiten zwischen diesen beiden Chromosomen gibt.

Die anderen euchromatischen Vorkommen intronhomologer Sequenzen bei Drosophila hydei beschränken sich auf das 4. Chromosom in drei der sieben untersuchten Genotypen. Gemeinsam ist diesen eine Position am distalen Ende bei 93 C. Zwei der drei Genotypen zeigen jeweils eine zusätzliche (nicht identische) Bande, einmal bei 78 C und einmal bei 84 E. In allen Fällen ist die Hybridisierung schwächer als die X-chromosomale. Es liegen hier nur wenige, möglicherweise eine einzige intronhomologe Sequenz pro Bande vor.

Das Genom eines attached-X-Genotyps besteht zu ungefähr 1 % aus intronhomologen Sequenzen (Kunz, unveröffentlichte Daten). Ausgehend von einer durchschnittlichen Intronlänge von 6 kb entspricht das ca. 800 Sequenzen im diploiden Genom. Diese befinden sich vermutlich bis auf wenige Kopien alle im Euchromatin

des X-Chromosoms.

Betrachtet man die Ergebnisse der Lokalisation intronhomologer Sequenzen unter dem Aspekt der möglichen Mobilität, so zeigen sich gravierende Unterschiede zu anderen bei Drosophila melanogaster bekannten mobilen Elementen wie copia, mdg oder P. (Rubin; 1983; Review).

- Die Kopienzahl dieser Elemente ist in der Regel gering. Sie liegt zwischen 20 - 30 bei copia und 50 - 80 bei P.
- Es gibt bei copia, mdg und P-Elementen keine Anzeichen für Cluster. An jeder euchromatischen Position findet man jeweils nur eine Kopie.
- Die chromosomalen Positionen von copia, mdg und P-Elementen variieren sehr stark zwischen den Genotypen, es gibt so gut wie keine gemeinsamen Positionen. Die Zahl der Orte ist zwar annähernd die gleiche, aber z.B. bei vier untersuchten Drosophila melanogaster-Stämmen mit je 19 oder mehr Kopien von copia ist nur eine Position allen Stämmen gemeinsam (Strobel et al.; 1979).

Die extranukleolären intronhomologen Sequenzen von Drosophila hydei liegen in ca. 800 Kopien vor. Diese befinden sich fast alle im X-Chromosom bei 2 A. Die genotypspezifischen Unterschiede sind gering und betreffen nur drei Positionen im 4. Chromosom. Doch selbst dort gibt es noch eine Position, die mehreren unterschiedlichen Genotypen gemeinsam ist.

Falls die Introns der rDNA bei Drosophila hydei überhaupt zur Gruppe der mobilen Elemente gehören oder gehörten, so ist ihre Mobilität in den untersuchten Genotypen gegenwärtig sehr gering oder erloschen.

3. Dichteposition intronhomologer Sequenzen im isopyknischen CsCl-Gradienten

In den drei untersuchten Genotypen wurden jeweils 4 - 5 DNA-Fraktionen abgetrennt, die starke Intronhomologie aufweisen. Diese liegen auf der dichten Seite des Gradienten in einem Bereich, der hohem G+C-Gehalt entspricht, außerhalb der Hauptbanden-DNA bei einer Dichte von 1.706 - 1.712 g/cm^3, entsprechend einem G+C-Gehalt von 50 - 56 %. Da der Intron-Klon selbst sehr G+C-reich ist, bestätigt das die Erwartungen.

Intronhomologe Sequenzen befinden sich in allen Fraktionen, unabhängig davon, ob deren G+C-Gehalt stark von dem des Introns abweicht. Im Vergleich zu den Fraktionen auf der dichten Seite des Gradienten, ist die Hybridisierungsintensität jedoch unbedeutend.

Das Schmelzverhalten des Intron-Klons zeigt, daß keine internen Repetitionen vorliegen. Außerdem ist die Sequenz mit 6 kb relativ lang und komplex, so daß die Bandierung intronhomologer Sequenzen an einer ganz engen Dichteposition nicht zu erwarten war.

Die Untersuchung klonierter Intronsequenzen hat gezeigt, daß sich deren Basenzusammensetzung verändern kann, die Homologie zum Intron aber noch groß genug ist, um durch Hybridisierung entdeckt werden zu können und daß Intronsequenzen mit Fremd-DNA assoziiert sein können. Da der größte Teil aller Intronsequenzen immer noch in einem Bereich hoher Dichte gefunden wird, bedeutet das, daß diese Fremd-DNA ebenfalls sehr G+C-reich ist.

Es konnte mit Hilfe der Autoradiogramme durch Scannen gezeigt werden, daß Genotypen mit X-chromosomalem Heterochromatin einen höheren Anteil intronhomologer Sequenzen aufweisen als Genotypen ohne X-chromosomales Heterochromatin.
In attached- X -Genotypen findet man ca. 800 intronhomologe Sequenzen, im y m ch/ y m ch-Genotyp ca. 1100 und im X^*/X^*-Genotyp ca. 1200. Diese zusätzlichen Sequenzen entstammen vermutlich zum größten Teil dem X-chromosomalen Heterochromatin.

4. Versuch der Zuordnung der chromosomalen Positionen intronhomologer Sequenzen zu bestimmten Banden des Restriktionsmusters

4.1. Genotypen mit attached-X-Chromosomen

Bei mehreren Genotypen mit attached-X-Chromosomen wurden insgesamt 4 chromosomale Loci mit Intronhomologie gefunden. Auf diese entfallen ca. 800 Intronsequenzen. Die genotypspezifischen Unterschiede im Restriktionsmuster sind daher kaum mit unterschiedlichen DNA-Sequenzen an verschiedenen chromosomalen Positionen zu erklären.
Die Restriktionsmuster von y m ch/Y, y m ch/ A·FP, y m ch/TKS·A und w lt/Y wurden von W.Kunz (unveröffentlichte Daten) intensiv untersucht. Dabei fällt auf, daß die ersten drei Genotypen gegenüber w lt/Y größere Unterschiede aufweisen als untereinander. Sie besitzen alle das gleiche attached-X-Chromosom, werden jedoch schon seit Jahren getrennt gehalten. Für sie wurden zwei chromosomale Positionen intronhomologer Sequenzen bestimmt: im 6. und im X-Chromosom bei 2 A. Der im Restriktionsmuster stärker abweichende w lt/Y-Genotyp enthält dagegen zusätzlich zwei euchromatische Intronpositionen im 4. Chromosom bei 93 C und 78 C. Nur für die dort lokalisierten Sequenzen könnte daher gelten, daß andersartige DNA an den zusätzlichen chromosomalen Loci ein verändertes Restriktionsmuster hervorruft. Die Unterschiede betreffen hauptsächlich die Verteilung der Banden und nicht deren Zahl. Größere Bandenzahl wäre bei zwei zusätzlichen chromosomalen Positionen nur dann zu erwarten, wenn es sich bei diesen ebenfalls um mehrfach vorhandene Sequenzen handelte. Die Hybridisierungsintensität deutet jedoch darauf hin, daß dort nur wenige - möglicherweise nur einzelne - intronhomologe Sequenzen vorhanden sind. Da Genotypen mit gleichen Positionen intronhomologer Sequenzen trotzdem unterschiedliche Bandenmuster zeigen und fast alle intronhomologen Sequenzen gehäuft im X-Chromosom

vorkommen, ist zu vermuten, daß die Unterschiede auf genotypspezifische Veränderungen innerhalb dieses Clusters zurückgehen.

4.2. Genotypen mit freien X-Chromosomen

Die vorangegangenen Betrachtungen gelten nicht für Genotypen mit freien X-Chromosomen und damit Intronsequenzen im X-chromosomalen Heterochromatin.
Außer durch die heterochromatische Position unterscheiden sie sich in der euchromatischen Lokalisation intronhomologer Sequenzen kaum von attached-X-Genotypen. Neben den geringen Variationen im 4. Chromosom liegen auch hier die meisten euchromatischen Intronsequenzen im X-Chromosom.
Die Restriktionsmuster von Genotypen mit freien X-Chromosomen unterscheiden sich jedoch wesentlich von Genotypen mit attached-X-Chromosomen. Wenn X-chromosomales Heterochromatin vorhanden ist, treten deutlich mehr Banden auf, die Hybridisierungsintensität ist stärker, und die Banden verteilen sich recht gleichmäßig über den Bereich von 1-20 kb. Wahrscheinlich sind diese Unterschiede auf die heterochromatischen Intronsequenzen zurückzuführen. Die in-situ-Hybridisierungen lassen keine Aussage über die Organisation der dortigen Sequenzen zu. Daß sie, obwohl Heterochromatin normalerweise unterrepliziert wird, überhaupt erkennbar werden, kann einerseits als Hinweis auf mehrfach vorhandene Sequenzen - möglicherweise in Tandem-Anordnung - gewertet werden, andererseits aber auch selektive Replikation der heterochromatischen Intronsequenzen bedeuten.

4.3. Bedeutung des X-chromosomalen Heterochromatins

Der Vergleich der Restriktionsmuster von y m ch/ y m ch und y m ch/Y läßt Schlußfolgerungen über das X-chromosomale Heterochromatin zu:

Das y m ch-attached-X-Chromosom ist aus freien y m ch-X-Chromosomen hervorgegangen. Die beiden unterscheiden sich nur im Anteil an Heterochromatin. Das Restriktionsmuster des y m ch/Y-Genotyps ähnelt jedoch eher anderen attached-X-Genotypen als dem y m ch/y m ch-Genotyp. Dieser wiederum zeigt im Aufbau des Musters Ähnlichkeit zum X^*/X^*-Genotyp, der ebenfalls X-chromosomales Heterochromatin enthält. Beide Genotypen unterscheiden sich von allen von W.Kunz (unveröffentlichte Daten) untersuchten attached-X-Genotypen durch das Fehlen von vermehrt auftretenden Banden um die einfache oder doppelte Intronlänge. Bei X^*/X^* sind alle extranukleolären Banden etwa gleich stark, bei y m ch/ y m ch sind einige Banden etwas stärker, jedoch nicht gehäuft, sondern über einen weiteren Bereich verstreut. Diese um bestimmte Längen gehäuft auftretenden Banden gibt es nur bei attached-X-Genotypen, die keine heterochromatischen Intronsequenzen enthalten. Sie müssen also euchromatischen Ursprungs sein.

Daß im Euchromatin tandemartig angeordnete Sequenzen stärker konserviert werden als im Heterochromatin, wurde bei Drosophila melanogaster an "heat-shock"-Sequenzen nachgewiesen (Lis et al.; 1981). Es wird vermutet, daß wiederholtes ungleiches cross-over für die Konservierung verantwortlich ist. Entgegen der Annahme, daß ungleiches cross-over ungleich macht, hat G.P.Smith (1973) für tandemartig angeordnete Sequenzen das Modell der "cross-over fixation" vorgestellt, das die Konservierung solcher Sequenzen durch ständiges intra- und interchromosomales ungleiches cross-over beschreibt.

Untersuchungen von W.Kunz an jahrelang getrennt gehaltenen Stämmen mit den gleichen attached-X-Chromosomen zeigen nur minimale oder gar keine Unterschiede in der Organisation der Intronsequenzen. All diesen Genotypen fehlt der größte Teil des X-chromosomalen Heterochromatins, welches sich bei X^*/X^* und y m ch/y m ch in naher Nachbarschaft zu den Intronsequenzen im Euchromatin des X-Chromosoms befindet.

Untersuchungen der rDNA verschiedener Arten von Chironomus haben eine hohe Korrelation zwischen Heterogenität der Gene und Vorkommen von Heterochromatin im Genom erkennen lassen. Dabei wird bei Zunahme des heterochromatischen Anteils in der Nähe der rDNA steigende Heterogenität innerhalb des rDNA-Clusters beobachtet (Degelmann et al.; 1979, Schmidt et al.; 1982). Hier wird vermutet, daß Vorkommen und räumliche Nähe von Heterochromatin zu Heterogenität innerhalb eines benachbarten Clusters führt.

In ähnlicher Weise scheint der intronhomologe Cluster von Drosophila hydei beeinflußbar: Ist wenig X-chromosomales Heterochromatin vorhanden, wird der euchromatische Cluster vereinheitlicht, ist mehr davon vorhanden, wird das verhindert, und es kommt stattdessen zu stärkerer Heterogenität.

5. Replikationsverhalten extranukleolärer Intronsequenzen bei der Polytänisierung

Zur Untersuchung des Replikationsverhaltens von Intronsequenzen während der Polytänisierung wurden die Hind III-Restriktionsmuster von Ganglien und Speicheldrüsen dreier Genotypen miteinander verglichen.

Das X/Y-Genom von Drosophila hydei besteht zu ca. 30 % aus Heterochromatin (Hennig et al.;1973).Davon macht das X-chromosomale ca. ein Drittel aus (entsprechend 8,5 % des Genoms). Dies fehlt bis auf das kinetochornahe allen attached-X-Genotypen. Das Euchromatin wird bei Drosophila hydei auf 1024 C hochpolytänisiert. Das Heterochromatin nimmt demgegenüber in der Regel nicht oder kaum an der Polytänisierung teil (Dickson et al.; 1971). Bei jeweils gleichen untersuchten DNA-Mengen besteht Ganglien-DNA (aus diploidem Gewebe) zu ca. 70 %, Speicheldrüsen-DNA (aus polytänem Gewebe) zu fast 100 % aus Euchromatin.

Betrachtet man nur die Ganglien, so ist bei Genotypen mit freien X-Chromosomen wieder die Zahl der Banden und die Hybridisierungsintensität gegenüber den attached-X-Genotypen erhöht. In den Speicheldrüsen von Genotypen mit freien X-Chromosomen ist beides deutlich gegenüber den Ganglien vermindert, im Fall von attached-X-Genotypen dagegen fast identisch.
Diese allgemeinen Unterschiede zeigen wieder, daß ein großer Teil der Intronsequenzen im X-chromosomalen Heterochromatin lokalisiert ist; denn die Unterschiede zwischen Ganglien und Speicheldrüsen von Genotypen mit freien X-Chronosomen sind erklärbar unter der Annahme, daß die heterochromatischen Intronsequenzen wie das Heterochromatin (im allgemeinen) unterrepliziert werden. Die Ähnlichkeit zwischen Ganglien und Speicheldrüsen von attached-X-Genotypen bedeutet, daß die euchromatischen Intronsequenzen mitpolytänisiert werden.

Detailuntersuchungen der Restriktionsmuster ergeben folgendes:

Banden, die nur in den Ganglien auftreten:
Das trifft für alle Genotypen zu, für y m ch/Y allerdings in ganz geringem Maß.
Das bedeutet, daß diese Banden durch heterochromatische Intronsequenzen hervorgerufen werden. Sie sind, wie es für Heterochromatin üblich ist, fast völlig unterrepliziert und können dann in den Speicheldrüsen nicht mehr identifiziert werden.
Daß im y m ch/Y-Genotyp auch einige wenige dieser ganglienspezifischen Banden auftreten, zeigt, daß nicht nur im kinetochorfernen X-chromosomalen Heterochromatin Intronsequenzen vorkommen, sondern daß auch anderweitig im Heterochromatin verstreut Sequenzen liegen. Der Anteil ist jedoch so gering, daß er durch in-situ-Hybridisierung nicht nachgewiesen werden kann.

Banden, die in den Speicheldrüsen schwächer sind als in den Ganglien:
Das trifft für attached-X-Genotypen wieder nur in ganz geringem Maß zu, macht aber bei Genotypen mit freien X-Chromosomen den größten Teil aller Banden aus.
Solche Banden werden wahrscheinlich ebenfalls durch heterochromatische Intronsequenzen hervorgerufen. Da sie im Gegensatz zu den unter 1. aufgeführten in den Speicheldrüsen identifizierbar sind, handelt es sich zwar auch um unterreplizierte, aber um mehrfach vorhandene Sequenzen. Möglicherweise liegen pro Bande auch mehrere unterschiedliche Intronsequenzen vor. Bandenunterschiede stellen mit Sicherheit Organisations- bzw. Sequenzunterschiede dar, umgekehrt bedeutet Bandengleichheit nicht unbedingt Sequenzgleichheit. Es ist durchaus zu erwarten, daß in einer autoradiographisch sichtbaren Bande verschiedene Intronsequenzen gleicher Länge übereinanderliegen, die unterschiedlichen chromosomalen Orten entstammen, unterschiedlich organisiert sind und möglicherweise sogar unterschiedliche intronhomologe Anteile aufweisen.

Banden, die zwischen Ganglien und Speicheldrüsen etwa gleich stark sind:
Das trifft für fast alle Banden des y m ch/Y-Genotys zu.
Da dieser Genotyp hauptsächlich euchromatische Intronsequenzen besitzt, die zum größten Teil im X-chromosomalen Euchromatin liegen, bedeutet das, daß diese Sequenzen mitpolytänisiert werden. Da allerdings gleiche DNA-Mengen untersucht wurden,

müßten bei voller Polytänisierung die Banden in den Speicheldrüsen vergleichsweise stärker erscheinen als in den Ganglien. Da das nicht der Fall ist, werden die Intronsequenzen des X-chromosomalen Clusters zwar mitpolytänisiert, aber nicht bis zum vollen euchromatischen Niveau.
Im zytologischen Präparat sieht man in der Region 2 A, in der sich der Intron-Cluster befindet, eine deutliche Einschnürung. Es gibt jedoch neben der hier vermuteten leichten Unterreplikation keine weiteren Hinweise dafür, daß sich dort intercalares Heterochromatin befindet (Berendes; 1966).

4. Banden, die in den Speicheldrüsen stärker als in den Ganglien sind oder nur dort auftreten:
Das trifft nur für Genotypen mit freien X-Chromosomen zu und gilt speziell für den X^*/X^*-Genotyp. Gleichzeitig zeigt dieser Genotyp einzeln vorkommende euchromatische Intronsequenzen. Es kann angenommen werden, daß diese Sequenzen voll polytänisiert werden und dann in den Speicheldrüsen stärker erscheinen als in den Ganglien. Das gilt zumindest für die beiden Speicheldrüsenbanden des X^*/X^*-Genotyps von 4.4 und 1.5 kb. Durch in-situ-Hybridisierung wurde gezeigt, daß dieser Genotyp bei 93 C eine - vermutlich einzelne - Intronsequenz besitzt. Durch die Untersuchung von klonierten Intronsequenzen und der subklonierten Fremdsequenzen wurde nachgewiesen, daß die Sequenz des Klons Aladin ebenfalls der Position 93 C entstammt. Das Hind III-Restriktionsmuster dieses Klons liefert drei intronhomologe Fragmente von 4.4, 1.5 und 0.6 kb. Außer dem 0.6 kb-Fragment, welches auch durch Introns der rDNA entsteht und überdeckt wird, treten genau diese Fragmente in den Speicheldrüsen stärker hervor.

Die einzeln im Euchromatin liegenden Intronsequenzen werden also bis zum vollen euchromatischen Niveau polytänisiert. Im Gegensatz dazu bleiben die euchromatisch gehäuft vorkommenden Sequenzen unter diesem Level und die heterochromatischen Intronsequenzen werden, wie für Heterochromatin üblich, gar nicht oder nur geringfügig polytänisiert.

6. Untersuchung der klonierten Intronsequenzen

Es wurden acht Klone untersucht, was ca. 1 % der gesamten extranukleolären Intronmenge eines attached-X-Genotyps entspricht. Keiner dieser acht Klone zeigt eine deutliche tandemartige Anordnung der Introns. Von 100 kb sind 40 kb intronhomolog, wobei in den einzelnen Klonen das Verhältnis von Intron- zu Fremdsequenz stark differiert. Die maximale Intronlänge enthält Cleopatra mit 8.2 kb, die minimale Ramses mit 1.5 kb. In beiden Fällen endet jedoch die intronhomologe Sequenz mit dem Phagenarm, so daß beide durchaus länger sein könnten. Gleiches gilt für Nemesis und Agamemnon.

Die kürzeste Intronhomologie, die beidseitig von Fremdsequenz umgeben ist, enthält Kalliope mit 2.7 kb. Dabei ist die Hybridiesierungsintensität der beiden Fragmente, die das zentrale Sal I-Eco RI/Kpn I - Fragment umschließen, deutlich geringer, so daß auf verminderte Homologie oder das Ende des homologen Bereiches innerhalb der betrachteten Fragmente geschlossen werden muß. Verminderte Hybridisierungshomologie zeigen auch die Klone, deren Restriktionsmuster stark von pDh 3-A11 abweichen (Nemesis, Penelope, Holzbock), so daß nicht Punktmutationen an den Restriktionsstellen, sondern weitergehende Änderungen der Struktur zu verminderter Homologie geführt haben.

Hinweise auf tandemartige Anordnung bietet nur Cleopatra. Dort kommt das 0.6 kb Hind III-Fragment zweimal vor.

Bei Agamemnon sind zwei intronhomologe Bereiche durch Fremdsequenz voneinander getrennt. Es kann nicht entschieden werden, ob es sich um Insertion von Fremdsequenz in eine Intronkopie handelt oder ob zwei Intronkopien voneinander getrennt werden.

Alle Klone - auch die mit stark verkürzter Intronsequenz - hybridisieren mit dem Intron-Subklon, dem 1 kb Eco-Fragment. Daneben zeigen sechs von acht Klonen - inklusive der mit stark verändertem Restriktionsmuster gegenüber dem Intron-Klon

pDh 3-A11 - die für diesen Bereich charakteristischen Schnittstellen der Restriktionsenzyme Eco RI und Kpn I.

Von Drosophila melanogaster und Calliphora erythrocephala ist bekannt, daß bei Intronverkürzung in der rDNA durch Deletion bevorzugt der linke, zu 28 S ß1-Sequenz orientierte Intronteil betroffen ist. Im rDNA-Intron von Drosophila hydei liegt das 1 kb Eco-Fragment ganz rechts nahe der 28 S ß2-Sequenz. Innerhalb der rDNA von Drosophila hydei gibt es keine Verkürzung der Introns. Dagegen scheinen die extranukleolären Intronsequenzen ebenfalls bevorzugt den linken (in der rDNA zur 28 S ß1-Sequenz orientierten) Intronteil zu verlieren. Betrachtet man die interspezifische Homologie von Introns, so ist der linke Intronteil konservativ (Barnett, Rae; 1976), intraspezifisch bleibt der rechte, weniger konservative Teil demgegenüber erhalten, während der linke Intronteil zu Deletionen neigt.

Von fünf untersuchten klonierten Intronsequenzen von Drosophila melanogaster zeigt nur eine strukturelle Ähnlichkeit zu Drosophila hydei (Dawid et al.; 1981; Kidd, Glover; 1980). Dieser Klon enthält eine ungenaue Intronkopie, der Rest ist Fremdsequenz. In allen anderen Klonen sind trotz Veränderungen des Restriktionsmusters tandemartige Intronkopien zu identifizieren. Von diesen sind einige durch Fremdsequenzen unterbrochen. Dabei handelt es sich in einem Fall um ein Element, welches wie die Introns selbst "target-site"-Duplikation aufweist, in anderen Fällen gehen die Unterbrechungen mit Deletionen von 1 - 1.5 kb einher. Bei Drosophila hydei hat nur Agamemnon Ähnlichkeit mit dieser Art von Organisation (Intronhomologie - Fremdsequenz - Intronhomologie), alle anderen Klone weichen deutlich ab.

Die Klonanalysen zeigen einzelne, von Fremdsequenzen umgebene, mehr oder weniger stark veränderte Intronsequenzen. Sie entsprechen also nicht der - besonders für attached-X-Genotypen - erwarteten Tandem-Anordnung. Die Ursache liegt vermutlich darin, daß die untersuchten Klone einer Wildtyp-Genbank

entstammen. Diese enthält freie X-Chromosomen und damit das X-chromosomale Heterochromatin. Wie bereits beschrieben unterscheidet sich die Organisation der Intronsequenzen eines Genotyps mit X-chromosomalem Heterochromatin von der der attached-X-Genotypen. Allerdings spricht die Tatsache, daß auch bei Genotypen mit freien X-Chromosomen alle intronpositiven Banden im Autoradiogramm mit dem Intron-Subklon, dem 1 kb Eco-Fragment, zu entdecken sind, dafür, daß trotz größerer Veränderungen vermutlich auch bei diesen Genotypen die meisten Intronsequenzen tandemartig angeordnet sind. Da jedoch in keinem der untersuchten Klone diese Anordnung nachgewiesen wird, könnte es sich bei diesen um acht, von der genomischen Organisation abweichende Ausnahmen handeln. Die Fragmente dieser Klone, die zwar mit dem gesamten Intron, aber nicht mehr mit dem Subklon hybridisieren,wären dann als einzelne Sequenzen im Autoradiogramm nicht mehr zu entdecken. Wenn man die Klone jedoch nicht als Ausnahmen ansähe, müßte der Befund, daß alle intronpositiven Banden im Autoradiogramm auch mit dem Subklon sichtbar werden, anders interpretiert werden als allein durch Tandem-Anordnung der Intronsequenzen.

Es werden zwischen 800 und 1200 Intronsequenzen auf 30 bis 40 Gelbanden verteilt, so daß im Durchschnitt in jeder Bande 25 bis 30 Intronsequenzen vorhanden sein müssen. Hierbei sei nochmal darauf hingewiesen, daß Bandengleichheit nicht automatisch Sequenzgleichheit bedeutet. Es ist also durchaus möglich, daß in einer Bande verschiedenartige Intronsequenzen liegen, von denen ein Teil Homologie zum 1 kb Eco-Fragment besitzt, ein Teil nicht. Da innerhalb einer Bande nicht zwischen den verschiedenen Anteilen unterschieden werden kann, entsteht ein verzerrtes Bild. Alle Fragmente scheinen zu hybridisieren, doch tatsächlich wäre es nur ein Teil davon.

Diese Art von Bandenüberlagerung kommt bei Genotypen mit freien X-Chromosomen tatsächlich vor. Die Hind III-Restriktionsmuster von X^*/X^*- und y m ch/y m ch-Genotypen zeigen nach Hybridisierung mit dem 1 kb Eco-Fragment auch das 0.6 kb-Frag-

ment markiert. Dieses liegt im intranukleolären Intron direkt neben dem 1 kb Eco-Fragment und besitzt zu diesem keine Homologie. Trotzdem wird im genomischen Southern-Autoradiogramm von X^*/X^*- und y m ch/ y m ch-Genotypen ein Fragment dieser Länge nach Hybridisierung mit dem 1 kb Eco-Fragment sichtbar. Es kann sich bei diesem also nicht mehr um das ursprüngliche Intron-Fragment handeln, sondern es muß eine stark veränderte extranukleoläre Sequenz entstanden sein, die in einem Hind III-Fragment von 0.6 kb Homologie zum 1 kb Eco-Fragment erhielt. Es liegen also bei 0.6 kb Sequenzen übereinander, die unterschiedlichen Teilen des Introns homolog sind.
Bei attached-X-Genotypen konnte diese Sequenzüberlagerung bei 0.6 kb nicht nachgewiesen werden.

Diese Daten zeigen,

- daß bei Genotypen mit X-chromosomalem Heterochromatin stärkere Veränderungen der extranukleolären intronhomologen Sequenzen vorkommen als bei attached-X-Genotypen,
- daß in einer Bande, die sowohl durch Hybridisierung mit dem gesamten Intron als auch mit dem Subklon sichtbar wird, verschiedenartige Intronsequenzen gleicher Länge zusammenliegen,
- daß Tandem-Anordnung der Intronsequenzen nicht die einzige Möglichkeit zur Erklärung der gleichartigen Bandenmuster nach Hybridisierung mit den beiden Intron-Klonen ist,
- daß also die untersuchten Phagen-Klone, die keine Tandem-Anordnung zeigen und veränderte Intronsequenzen und Fremdsequenzen enthalten,bei Genotypen mit freien X-Chromosomen nicht zwangsläufig Ausnahmen der tatsächlichen genomischen Organisation der Intronsequenzen darstellen.

7. Untersuchung der subklonierten Fremdsequenzen

Die Restriktionsmuster der Fremdsequenzen, in die die intron-homologen eingebettet sind, zeigen keine Ähnlichkeit untereinander.

Durch Untersuchung der Subklone konnten diese Sequenzen jedoch in zwei Klassen eingeteilt werden: die mit einander homologen Fremdsequenzen - Penelope, Holzbock, Ramses - und die mit nicht-homologen Sequenzen - Aladin, Agamemnon, Nemesis, Ramses, Kalliope .

Durch den Subklon Nem 1, dessen Sequenz ca. 0.25 % des Genoms ausmacht, entsteht nach Hybridisierung mit genomischer DNA eine einzelne Bande im Autoradiogramm - entsprechend der Länge des Subklons.

Alle anderen Subklone zeigen im Autoradiogramm gleichartiges Hybridisierungsverhalten mit genomischer DNA. Es entsteht ein mehr oder weniger hochmolekularer Schmier mit teilweise darüber erkennbaren Banden, wie er auch für andere mittelrepetitive DNA beobachtet wurde (Young; 1979).

Durch in-situ-Hybridisierungen, die wie die Autoradiogramme keine Unterschiede zwischen den Genotypen erkennen lassen, kann die chromosomale Herkunft zweier Phagen-Klone bestimmt werden.

Aladin stammt aus dem 4. Chromosom von 93 C. Die Fremdsequenz Ala 8 tritt auch in Genotypen auf, die dort keine Intron-homologie erkennen lassen. Sie liegt im Gegensatz zu allen anderen subklonierten Fremdsequenzen nur in wenigen, möglicherweise nur einer Kopie vor.

Agamemnon stammt aus dem X-chromosomalen Euchromatin. Die Fremdsequenz Aga 8 hybridisiert stark mit 2 A und mit zwei weiteren Regionen des X-Chromosoms: mit 1 A und 1 B. Diese Sequenz ist mittelrepetitiv, kommt jedoch im Heterochromatin nicht vor.

Die Herkunft der anderen Phagen-Klone ließ sich nicht genau bestimmen. Die Hybridisierung bedeckt in allen Fällen das Chromozentrum und die proximalen Enden der Chromosomen und damit auch die Intronsequenzen im X-chromosomalen Euchromatin. Bei diesen Fremdsequenzen handelt es sich also um mittelrepetitive DNA-Familien.

Bei Drosophila melanogaster wurde gezeigt, daß viele mittelrepetitive Sequenzen eine bewegliche Komponente des Genoms darstellen (Young; 1979). Weitere Untersuchungen ergaben, daß bei Drosophila melanogaster die mit Introns assoziierten Fremdsequenzen mittelrepetitiv an vielen Orten im Genom vorkommen (Dawid et al .; 1981, Kidd,Glover,1980). Dabei gibt es große Unterschiede zwischen den Genotypen in den chromosomalen Positionen dieser Sequenzen, so daß sie bei Drosophila melanogaster als mobil angesehen werden.

Drosophila hydei unterscheidet sich sowohl aufgrund der Intronorganisation als auch in der Struktur der Fremd-DNA von Drosophila melanogaster. Die meisten Fremdsequenzen von Drosophila hydei stellen zwar auch mittelrepetitive DNA dar, sie befinden sich aber hauptsächlich im Heterochromatin und dem heterochromatinnahen Euchromatin.
Es gibt keine Unterschiede der chromosomalen Positionen zwischen den Genotypen. Daher ist anzunehmen, daß bei Drosophila hydei die die Introns umgebenden Sequenzen wenig oder gar nicht mobil sind.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Durch in-situ-Hybridisierungen eines Intron-Klons der rDNA mit polytänen Chromosomen verschiedener Genotypen von Drosophila hydei wurden die chromosomalen Positionen der extranukleolären Intronsequenzen bestimmt. Neben diffuser Markierung des 6. Chromosoms zeigen alle untersuchten Genotypen starke Markierung einer Position im X-chromosomalen Euchromatin bei 2 A. Dort befindet sich der größte Teil aller Intronsequenzen. Daneben gibt es bei einigen Genotypen zusätzliche Positionen im 4. Chromosom. Diese gehen wahrscheinlich auf wenige, möglicherweise einzeln vorliegende Sequenzen zurück.

Bei Genotypen mit attached-X-Chromosomen findet man ca. 800 Intronsequenzen im diploiden Genom. Durch Scannen von Autoradiogrammen wurde ermittelt, daß Genotypen mit freien X-Chromosomen 300 - 400 Intronsequenzen mehr aufweisen. Diese zusätzlichen Sequenzen entstammen vermutlich zum Teil dem X-chromosomalen Heterochromatin.

Obwohl die Introns Ähnlichkeiten zu anderen bekannten mobilen Elementen besitzen, ist hauptsächlich wegen der geringen Unterschiede der chromosomalen Positionen zwischen den Genotypen anzunehmen, daß Introns der rDNA von Drosophila hydei gar nicht oder nur wenig mobil sind.

Untersuchungen an DNA aus diploidem und polytänem Gewebe haben gezeigt, daß heterochromatische Intronsequenzen - wie für Heterochromatin üblich - unterrepliziert sind. Die vereinzelt im Euchromatin lokalisierten Sequenzen werden voll polytänisiert. Demgegenüber werden die, zwar ebenfalls im Euchromatin, aber gehäuft auftretenden Intronsequenzen mitpolytänisiert, aber nicht bis zum vollen euchromatischen Niveau.

Es treten genotypspezifische Unterschiede im Restriktionsmuster genomischer DNA nach Hybridisierung mit Intronsequenzen auf. Das trifft auch für Genotypen zu, bei denen sich fast sämtliche Intronsequenzen an der einen Position im X-chromosomalen Euchromatin befinden. Das läßt vermuten, daß die Unterschiede im Bandenmuster auf genotypspezifische Veränderungen an diesem X-chromosomalen Intron-Cluster zurückgehen.

Hybridisierungen mit einem Subklon des Introns ließen annehmen, daß bei Genotypen mit attached-X-Chromosomen die Intronsequenzen tandemartig angeordnet sind, mit Längenvariationen um die Intronlänge von 6 kb. Bei Genotypen mit X-chromosomalem Heterochromatin wird eine andersartige Organisation mit starken Veränderungen der Intronsequenzen vermutet. Dabei scheint das Vorhandensein von X-chromosomalem Heterochromatin einen Einfluß auf Organisation und Veränderung der Intronsequenzen auszuüben.

Die Untersuchung von klonierten extranukleolären Intronsequenzen aus einer Wildtyp-Genbank (mit X-chromosomalem Heterochromatin) lassen neben veränderten Restriktionsmustern, verminderter Homologie und Verlust von Intronteilen im Vergleich zum Intron der rDNA keine eindeutige Tandem-Anordnung erkennen. In allen Klonen treten neben Intronsequenzen nicht-intronhomologe Fremdsequenzen auf. Bei diesen handelt es sich um mittelrepetitive DNA-Familien. Diese befinden sich hauptsächlich im Heterochromatin und den kinetochornahen Enden der Chromosomen. Wie das Intron selbst, sind auch diese Sequenzen bei Drosophila hydei nicht oder nur wenig mobil.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

Barnett, F., Rae, P.M.M.: A 9.6 kb intervening sequence in Drosophila virilis rDNA and sequence homology in rDNA interruptions of diverse species of Drosophila and other diptera
Cell 16 763 (1976)

Beck, H.: New compound (1) chromosomes and the production of large quantities of X/O males in Drosophila hydei
Genet. Res., Camb. 26 313 (1976)

Beckingham, K.: Insect rDNA. In: The cell nucleus, Vol. 10 205 (1982), H.Busch, L.Rothblum (Hrsg.), Academic Press New York

Beckingham, K., Rubacha, A.: Different chromatin states of the intron$^-$ and type 1 intron$^+$ rRNA genes of Calliphora erythrocephala
Chromosoma (Berl.) 90 311 (1984)

Beckingham, K., White, R.: The ribosomal DNA of Calliphora erythrocephala; an analysis of hybrid plasmids containing ribosomal DNA
J.Mol.Biol. 137 349 (1980)

Benton, W.D., Davis, R.W.: Screening λgt recombinant clones by hybridization to single plaques in situ
Science 196 180 (1977)

Berendes, H.D.: The salivary gland chromosomes of Drosophila hydei Sturtevant
Chromosoma (Berl.) 14 195 (1963)

Berendes, H.D.: Differential replication of male and female X-chromosomes in Drosophila
Chromosoma (Berl.) 20 32 (1966)

Calos, M.P., Miller, J.H.: Transposable elements
Cell 20 579 (1980)

Clarke, L., Carbon, J.: Biochemical construction and selection of hybrid plasmids containing specific segments of the E.coli genome
Proc.Natl.Acad.Sci.(USA) 72 4361 (1975)

Dawid, I., Botchan, P.: Sequences homologous to the ribosomal insertion occur in the Drosophila genome outside the nucleolus organizer
Proc.Natl.Acad.Sci.(USA) 74 4233 (1977)

Dawid, I., Rebbert, M.: Nucleotide sequences at the boundaries between gene and insertion regions in the rDNA of Drosophila melanogaster
Nucleic Acids Res. 19 5011 (1981)

Dawid, I., Lauth, M., Wellauer, P.K.: Repetetive DNA elements related to the ribosomal insertion of Drosophila melanogaster
In: Mobilization and reassembly of genetic information, Hrsg. W.R.Scott, R.Weiner, D.R.Joseph, Miami Winter Symposium 17 217 (1980)
Academic Press New York

Dawid, I., Long, E.O., DiNocera, P.P., Pardue, M.L.: Ribosomal insertion like elements in Drosophila melanogaster are interspersed with mobile elements
Cell 25 399 (1981)

Degelmann, A., Royer, H.-D., Hollenberg, C.P.: The organization of the ribosomal RNA genes of Chironomus tentans and some closely related species
Chromosoma (Berl.) 71 263 (1979)

Denhardt, D.T.: A membrane-filter technique for the detection of complementary DN
Biochem.Biophys.Res.Comm. 23 641 (1966)

Dickson, E., Boyd, J.B., Laird, C.D.: Sequence diversity of polytene chromosome DNA from Drosophila hydei
J.Mol.Biol. 61 615 (1971)

Faye, G., Dennebouy, N., Kujawa, C., Jacq, C.: Inserted sequence in the mitochondrial 23 S ribosomal RNA gene of the yeast Saccharomyces cerevisiae
Molec.Gen.Genet. 168 101 (1979)

Franz, G.: Zahl der rRNA-Gene bei Drosophila hydei-Stämmen mit einem Überschuß an Y-chromosomalen und einem Defizit an X-chromosomalen NOs
Diplomarbeit, Math.-Nat.-Fak. Universität Düsseldorf (1979)

Franz, G.: Messung der rRNA-Genzahlen bei Drosophila hydei: 1. Spezielle Aspekte der Überreplikation 2. Die Mutation bobbed
Dissertation, Math.-Nat.-Fak. Universität Düsseldorf (1982)

Franz, G.,Kunz, W.: Intervening sequence in ribosomal rRNA-genes and bobbed phenotype in Drosophila hydei
Nature 292 638 (1981)

Franz, G., Kunz, W., Grimm, C.: Determination of the region of rDNA involved in polytenization in salivary glands of Drosophila hydei
Molec.Gen.Genet. 191 74 (1983)

Glätzer, K.H.: Length of transcribed rDNA repeating units in spermatocytes of Drosophila hydei: only genes without an intervening sequence are expressed
Chromosoma (Berl.) 75 161 (1979)

Glover, D., Hogness, D.: A novel arrangement of the 18 S and 28 S sequences in a repeating unit of Drosophila melanogaster
Cell 10 167 (1977)

Gourse, R.L., Gerbi, S.: Fine structure of rRNA: IV. Extraordinary evolutionary conservation in sequences that flank introns in rDNA
Nucleic Acids Res. 8 3623 (1980)

Grunstein, M., Hogness, D.: Colony hybridization: a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene
Proc.Natl.Acad.Sci.(USA) 72 3961 (1975)

Hawley, R.S., Tartof, K.D.: The ribosomal DNA of Drosophila melanogaster is organized differently from that of Drosophila hydei
J.Mol.Biol. 163 499 (1983)

Hennig, W., Leoncini, O., Link, B.: Heterochromatin, simple sequence DNA, and differential staining patterns in Drosophila chromosomes
In: Modern aspects of cytogenetics: constitutive heterochromatin in man, Hrsg: R.R.Pfeiffer, Schattauer Stuttgart and New York (1973)

Hennig, W., Link, B., Leoncini, O.: The location of the nucleolus organizer regions in Drosophila hydei
Chromosoma (Berl.) 51 57 (1975)

Hess, O.: Genetic functions corralated with unfolding lampbrush loops by the Y-chromosome in spermatocytes of Drosophila hydei
Molec.Gen.Genet. 106 328 (1970)

Hess, O.: Genetics of Drosophila hydei Sturtevant
In: Genetics and biology of Drosophila Vol. I C 1343 (1976)
Hrsg: E.Novitski, M.Ashburner, Academic Press New York

Hochman, B.: The fourth chromosome of Drosophila melanogaster
In: The genetics and biology of Drosophila Vol. 1 B 903 (1978)
Hrsg: M.Ashburner, E.Novitski, Academic Press New York

Holmes, D.S., Quigley, M.: A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids
Annu.Biochem 114 193 (1981)

Hoopes, B.C., McClure, W.R.: Precipitation of DNA-fragments by spermine
Nucleic Acids Res. 9 5493 (1981)

Kidd, S.J., Glover, D.M.: A DNA-segment of Drosophila melanogaster which contains five tandemly repeating units homologous to the major rDNA insertion
Cell 19 103 (1980)

Kohorn, B.D., Rae, P.M.M.: Accurate transcription of truncated ribosomal DNA templates in a Drosophila cell free system
Proc.Natl.Acad.Sci.(USA) 79 1501 (1982)

Kunz, W., Petersen, G., Renkawitz-Pohl, R., Glätzer, K.H., Schäfer, M.: Distribution of spacer length classes and the intervening sequence among different nucleolus organizers in Drosophila hydei
Chromosoma (Berl.) 83 145 (1981)

Lecanidou, R., Eickbush, T., Kafatos, F.C.: Ribosomal genes of Bombyx mori: a minor fraction of repeating units contain insertions
Nucleic Acids Res. 12 4703 (1984)

Levinger, L., Varshavsky, A.: Protein DI preferentially binds A+T-rich DNA in vitro and is a component of Drosophila melanogaster nucleosomes containing A+T-rich satellite DNA
Proc.Natl.Acad.Sci.(USA) 79 7152 (1982)

Lis, J.T., Ish-Horowicz, D., Pinchin, S.M.: Genomic organization and transcription of the αß heat shock DNA in Drosophila melanogaster
Nucleic Acids Res. 9 5297 (1981)

Long, E.O., Dawid, I.: Expression of ribosomal rDNA-insertions in Drosophila melanogaster
Cell 18 1185 (1979)

Long, E.O., Rebbert, M., Daeid, I.: Structure and expression of rRNA genes of Drosophila melanogaster interrupted by type 2 insertions
Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol. 45 Part 2 667 (1980)

Long, E.O., Rebbert, M., Dawid, I.: Nucleotide sequence of the initiation site for ribosomal RNA transcription in Drosophila melanogaster: comparison of genes with and without insertions
Proc.Natl.Acad.Sci.(USA) 78 1513 (1981)

Long, E.O., Collins, M., Kiefer, B., Dawid, I.: Expression of the ribosomal DNA insertion in bobbed mutants of Drosophila melanogaster
Molec.Gen.Genet. 182 377 (1981)

Mandal, R.K., Dawid, I.: The nucleotide sequence at the transcription termination site of ribosomal RNA in Drosophila melanogaster
Nucleic Acids Res. 9 1801 (1981)

Mandel, M., Marmur, J.: Use of ultraviolet absorbance-temperature profile for determining the guanine plus cytosine content of DNA
In: Methods in Enzymology Vol. XII Part B
Hrsg: L.Grossman, K.Moldave

Mulder, M.P., van Duijn, P., Gloor, H.J.: The replicative organization of DNA of polytene chromosomes of Drosophila hydei
Genetica 39 385 (1968)

Pardue, M., Dawid, I.: Chromosomal location of two DNA segments that flank ribosomal insertion like sequences in Drosophila: flanking sequences are mobile elements
Chromosoma (Berl.) 83 29 (1981)

Pardue, M.L., Gall, J.G.: Nucleic acid hybridizations to the DNA of cytological preparations
In: "Meth.Cell.Biol." Vol. X 1 (1975)

Peacock, W.J., Appels, R., Endow, S., Glover, D.: Chromosomal distribution of the major insert in Drosophila melanogaster 28 S rRNA genes
Genet.Res., Camb. 37 209 (1981)

Peacock, W.J., Lohe, A.R., Gerlach, W.L., Dunsmuir, P., Dennis, E.S., Appels, R.: Fine structure and evolution of DNA in heterochromatin Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol. 42 1121 (1978)

Pellegrini, M., Manning, J., Davidson, N.: Sequence arrangement of the rDNA of Drosophila melanogaster
Cell 10 213 (1977)

Rae, P.M.M., Kohorn, B.D., Wade, R.P.: The 10 kb Drosophila virilis 28 S rDNA intervening sequence is flanked by a direct repeat of 14 base pairs of coding sequence
Nucleic Acids Res. 8 3491 (1980)

Renkawitz, R.: Characterization of two moderatly repetetive DNA components localized within the ß-heterochromatin of Drosophila hydei
Chromosoma (Berl.) 66 225 (1978)

Renkawitz-Pohl, R., Glätzer, K.H., Kunz, W.: Ribosomal RNA genes with an intervening sequence are clustered within the X-chromosomal ribosomal DNA of Drosophila hydei
J.Mol.Biol. 148 95 (1981)

Renkawitz-Pohl, R., Glätzer, K.H., Kunz, W.: Characterization of cloned rDNA from Drosophila hydei
Nucleic Acids Res. 8 4513 (1980)

Renkawitz-Pohl, R., Matsumoto, L., Gerbi, S.: Two distinct intervening sequences in different rDNA repeat units of Sciara coprophila
Nucleic Acids Res. 9 3747 (1981)

Rigby, P.W.J., Dieckmann, M., Rhodes, C., Berg, P.: Labeling deoxyribonucleic acids to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I
J.Mol.Biol. 113 237 (1977)

Ritossa, F.M., Atwood, K.C., Lindsley, D.L., Spiegelman, S.: On the chromosomal distribution of DNA complementary to ribosomal and soluble RNA
Nat.Cancer Inst.Monograph 23 449 (1966)

Rochaix, J.D., Malnoe, P.: Anatomy of the chloroplast ribosomal DNA of Chlamydomonas reinhardii
Cell 15 661 (1978)

Roiha, H., Miller, J.R., Woods, L.C., Glover, D.M.: Arrangements and rearrangements of sequences flanking the two types of rDNA insertions in Drosophila melanogaster

Rubin, G.M.: Dispersed repetetive DNAs in Drosophila
In: Mobile genetic elements, J.Shapiro (Hrsg.) (1983)

Schäfer, M., Kunz, W.: rDNA in Locusta migratoria is very variable: two introns and extensive restriction site polymorphism in the spacer
eingereicht zur Veröffentlichung

Schäfer, U., Kunz, W.: Two separated nucleolus organizers on the Drosophila hydei Y-chromosome
Molec.Gen.Genet. 137 365 (1975)

Schmidt, E.R., Godwin, E.A., Keyl, H.-G., Israelewski, N.: Cloning and analysis of ribosomal DNA of Chironomus thummi piger and Chironomus thummi thummi
Chromosoma (Berl.) 87 389 (1982)

Sharp, Z.D., Gandhi, V.V., Procunier, J.D.: X chromosome nucleolus organizer mutants which alter major type I repeat multiplicity in Drosophila melanogaster
Molec.Gen.Genet. 190 438 (1983)

Smith, P.G.: Unequal crossover and the evolution of multigene families
Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol. 38 507 (1973)

Smith, V.L., Beckingham, K.: The intron boundaries and flanking sequences of Calliphora erythrocephala rDNA
Nucleic Acids Res. 12 1707 (1984)

Southern, E.M.: Detection of specific sequences among DNA-fragments separated by gel electrophoresis
J.Mol.Biol 98 503 (1975)

Spencer, W.P.: Gene homologies and the mutants of Drosophila hydei
In: Genetics, Paleontology, and Evolution
Hrsg: Jepsen, G.L., Mayr, E., Simpson, G.G.
Princeton, Princeton University Press 1949

Strobel, E. Dunsmuir, P. Rubin, G.M.: Polymorphism in the chromosomal locations of elements 412, copia and 297 dispersed repeated gene families in Drosophila
Cell 17 429 (1979)

Swanstrøm, R., Shank, P.R.: X-ray intensifying screens greatly enhance the detection by autoradiography of the radioactive isotopes ^{32}P and ^{125}I
Annu.Biochem. 86 184 (1978)

Thuring, R.W.J., Sanders, J.P.M., Borst, P.: A freeze-squeeze method for recovering long DNA from agarose gels
Analyt.Biochem. 66 213 (1975)

Wellauer, P.K., Dawid, I., Tartof, K.D.: X and Y chromosomal ribosomal DNA of Drosophila: comparison of spacers and insertions
Cell 14 269 (1978)

Wild, M.A., Gall. G.J.: An intervening sequence in the gene coding for 25 S rRNA of Tetrahymena pigmentosa
Cell 16 565 (1979)

Yamomoto, K.R., Alberts, B.M.: Rapid bacteriophage sedimentation in the presence of polyethylene glycol and its application to large-scale virus purification
Virology 40 734 (1970)

Young, M.W.: Middle repetetive DNA: a fluid component of the Drosophila genome
Proc.Natl.Acad.Sci.(USA) 76 6274 (1979)

VII. ANMERKUNGEN

Herrn Prof.Dr.W.Kunz danke ich für die Überlassung des Themas und die Betreuung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Prof.O.Hess danke ich für das Interesse und die Unterstützung meiner Arbeit.

Des weiteren gilt mein Dank Frau Dr.M.Schäfer und allen Angehörigen des Instituts für Genetik, die am Gelingen meiner Arbeit Anteil genommen haben.

Die Arbeit wurde unterstützt durch Mittel der Graduiertenförderung und durch Mittel, die Herrn Prof.Dr.W.Kunz von der Deutschen Forschungsgemeinschaft zur Verfügung gestellt wurden.